

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 476 798**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2007** **E 07874550 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014** **EP 2101813**

54 Título: **Nueva diana de péptido glucosilado en células neoplásicas**

30 Prioridad:

27.11.2006 US 867285 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

15.07.2014

73 Titular/es:

**PATRY'S LIMITED (100.0%)
Level 2 517 Flinders Lane
Melbourne VIC 3000, AU**

72 Inventor/es:

VOLLMERS, HEINZ PETER

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 476 798 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nueva diana de péptido glucosilado en células neoplásicas.

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un péptido glucosilado o glucoproteína que se une a un anticuerpo, conocido como SAM-6. La glucoproteína, indicada Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R presenta aparente homología de secuencias/comparte identidad con la secuencia de polipéptidos de Grp78 (proteína 78 regulada por glucosa).

Introducción

10 Hay una necesidad de métodos para tratar la proliferación celular no deseable o anormal, tal como trastornos hiperproliferativos celulares, incluyendo neoplasias, tumores y tumores malignos. La invención estudia esta necesidad y proporciona beneficios relacionados.

15 CANCER RESEARCH 64, 3.900-3.906, 1 de junio de 2.004 describe la muerte celular específica del tumor por acumulación intracelular de lípidos inducida por anticuerpos. La proteína descrita en este documento presenta un peso molecular de 140 kDa. La patente internacional WO 2005/047332 A1 muestra un anticuerpo que, sin embargo, no presenta una secuencia de cadena pesada idéntica a la secuencia de cadena pesada como se describe en la presente memoria. Electrophoresis 1.997, 18, 605-613 describe una Proteína GRP 78 humana identificada en un gel bidimensional de una estirpe celular LIM 1215 de carcinoma de colon humano. Esta proteína presenta una masa molecular de 76,0 kDa y la secuencia de aminoácidos tiene sólo restos de 22 aminoácidos de largo.

Sumario

20 La invención proporciona una glucoproteína aislada o purificada indicada como Receptor de SAM-6 (SAM-6/R), en la que dicha glucoproteína de SAM-6/R presenta un peso molecular aparente en un intervalo de aproximadamente 80-82 kilodaltons (kDa), cuando se determina por electroforesis en gel desnaturizante, una secuencia que comprende la SEC ID N°: 1, presenta al menos un resto carbohidrato unido a nitrógeno (N) u oxígeno (O) distinto de Grp78, en la que un anticuerpo indicado SAM-6 se une específicamente a la glucoproteína y en la que el tratamiento de la glucoproteína de SAM-6/R con una O-glucosidasa reduce la unión del anticuerpo SAM-6 a la glucoproteína, en la que el anticuerpo SAM-6 comprende:

(a) una secuencia de la región variable de cadena pesada, en la que la secuencia de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 15 y

30 (b) una secuencia de la región variable de cadena ligera, en la que la secuencia de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 13.

35 La glucoproteína de SAM-6/R presenta un peso molecular aparente en un intervalo de aproximadamente 80-82 kilodaltons (kDa), cuando se determina por electroforesis en gel desnaturizante, al menos un resto carbohidrato unido a nitrógeno (N) u oxígeno (O) distinto de Grp78 y un anticuerpo indicado SAM-6 se une específicamente a la glucoproteína de SAM-6/R. En otra realización, una glucoproteína de SAM-6/R presenta un peso molecular aparente en un intervalo de aproximadamente 80-82 kilodaltons (kDa), cuando se determina por electroforesis en gel desnaturizante, al menos un resto carbohidrato unido a 25 nitrógeno (N) u oxígeno (O) distinto de un resto carbohidrato de Grp78 y homología de la secuencia de polipéptidos a Grp78, como se explica en la SEC ID N°: 1 (por ej., al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de identidad).

40 En diversos aspectos, las glucoproteínas aisladas y purificadas indicadas como Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R incluyen una secuencia de aproximadamente 655 aminoácidos, presentan un dominio transmembrana de aproximadamente 17 aminoácidos, presentan un dominio extracelular de aproximadamente 220 aminoácidos o presentan un dominio intracelular de aproximadamente 411 aminoácidos. En diversos aspectos adicionales, el Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o la glucoproteína de SAM-6/R se caracteriza como que se expresa en una célula neoplásica, cancerígena o tumoral, por ejemplo, una estirpe celular de carcinoma de páncreas o estirpe celular de carcinoma gástrico, indicadas respectivamente como BXPC-3 (Depósito ATCC N° CRL-1687) y 23132/87 (Depósito DSMZ N° ACC 201).

45 En otro aspecto, el resto carbohidrato unido de las glucoproteínas aisladas y purificadas indicado como Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R se une a un resto asparagina, serina o treonina (por ej., de la SEC ID N°: 1). En un aspecto más, el anticuerpo SAM-6 se une a una porción de la glucoproteína que incluye el resto carbohidrato unido a N u O o se une al resto carbohidrato unido a N u O. En aspectos adicionales, el tratamiento de Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R con una enzima glucosidasa (por ej., una O-glucosidasa o una N-glucosidasa, tal como endoglucosidasa H o endoglucosidasa F) reduce el peso molecular aparente de la glucoproteína por aproximadamente 1-5 kilodaltons (kDa) o reduce la unión de anticuerpo SAM-6 al Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R. En otro aspecto más, el resto carbohidrato unido a N u O incluye uno o más de: galactosa, acetilgalactosa, manosa, fucosa, glucosa, acetilglucosa, ácido siálico, N-

acetilgalactosamina o N-acetilglucosamina.

La invención proporciona además secuencias de ácidos nucleicos que codifican el Receptor de SAM-6 de la glucoproteína (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R. En una realización, una secuencia de ácidos nucleicos es al menos 75-90% o más, complementaria u homóloga a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la SEC ID N°: 1 o una subsecuencia de los mismos. En otra realización, una secuencia de ácidos nucleicos codifica a un Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R capaz de tener unido a la misma al menos un resto carbohidrato unido a nitrógeno (N) u oxígeno (O) distinto de un resto carbohidrato de Grp78. En aspectos particulares, un ácido nucleico codifica una subsecuencia de Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R. En otros aspectos, una secuencia de ácidos nucleicos presenta una longitud de aproximadamente 10-20, 20-30, 30-50, 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-400, 400-500, 500-1.000, 1.000-2.000 nucleótidos. En aspectos adicionales, una secuencia de ácidos nucleicos se hibrida específicamente a un ácido nucleico que codifica la SEC ID N°: 1 o una subsecuencia de los mismos o se hibrida específicamente a una secuencia de ácidos nucleicos complementaria a un ácido nucleico que codifica la SEC ID N°: 1 o una subsecuencia de los mismos. En más aspectos, un ácido nucleico es un polinucleótido antisentido, un ARN de pequeña interferencia o un ácido nucleico ribozima que se hibrida específicamente a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R y reduce la expresión del Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R. Los polinucleótidos antisentido, ARN de pequeña interferencia y polinucleótidos ribozimas pueden presentar una longitud de aproximadamente 10-20, 20-30, 30-50, 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-400, 400-500, 500-1.000, 1.000-2.000 nucleótidos y ser al menos 90% complementarios u homólogos a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la SEC ID N°: 1 o una subsecuencia de los mismos. En otros aspectos más, la secuencia de ácidos nucleicos puede incluir una secuencia de control de la expresión o un vector (por ej., un vector vírico, bacteriano, fúngico o de mamífero).

La invención proporciona adicionalmente células hospedadoras transformadas con ácido nucleico que codifica el Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R o una subsecuencia del mismo. Las células hospedadoras incluyen células eucariotas (por ej., una célula hiperproliferativa, célula inmortalizada, célula neoplásica, célula tumoral o célula cancerígena) y no eucariotas, que se pueden transformar de manera estable o de manera transitoria con el ácido nucleico o vector.

La invención, por otra parte, proporciona anticuerpos policlonales y monoclonales aislados y purificados que se unen específicamente a Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R o una subsecuencia de los mismos. El anticuerpo de la invención se refiere a un anticuerpo aislado o purificado o subsecuencia del mismo que comprende:

(a) una secuencia de la región variable de cadena pesada, en la que la secuencia de la región variable de cadena pesada comprende:

(i) una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia mostrada en la SEC ID N°: 18 y

(ii) una región determinante de la complementariedad (CDR) con 100% de identidad para la CDR3 (ARDRLAVAGRPFDY) mostrada en la SEC ID N°: 17 y

(b) una secuencia de la región variable de cadena ligera, en la que la secuencia de la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia mostrada en la SEC ID N°: 13.

En una realización, un anticuerpo se une específicamente a un epítipo de Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R que incluye al menos un resto carbohidrato unido a N u O (por ej., dominio extracelular). En otra realización, no se une un anticuerpo a un epítipo que comprende un resto carbohidrato unido a N u O. En una realización más, un anticuerpo se une a LDL (por ej., LDL oxidado, "oxLDL"). En una realización adicional, un anticuerpo compite por la unión de anticuerpo de SAM-6 al Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R o una subsecuencia del mismo o inhibe o bloquea la unión de anticuerpo de SAM-6 (por ej., al menos 50% de la unión de anticuerpo de SAM-6) a Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R o una subsecuencia de los mismos (por ej., cuando se determina en un ensayo ELISA) o compite por la unión de anticuerpo de SAM-6 a LDL (por ej. oxLDL) o inhibe o bloquea la unión de anticuerpo de SAM-6 (por ej., al menos 50% de la unión de anticuerpo de SAM-6) a LDL u oxLDL (por ej., cuando se determina en un ensayo ELISA). En otras realizaciones más, un anticuerpo se une a células que expresan el Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R (por ej., una célula neoplásica, cancerígena o tumoral o estirpe celular tal como células BXP3-3 o 23132/87) y estimula o induce la muerte celular, lisis o muerte celular programada o activación de una caspasa (por ej., caspasa-3, caspasa-8 o caspasa-9) *in vitro* o *in vivo*. En otra realización más, el tratamiento de Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R con una O-glucosidasa reduce la unión del anticuerpo al Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R o a LDL u oxLDL. En otras realizaciones adicionales, el anticuerpo presenta una afinidad de unión para el Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R dentro de aproximadamente 1-5.000 veces la afinidad de unión de SAM-6 o una afinidad de unión para Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R dentro de aproximadamente $KD 10^{-6}$ M a aproximadamente $KD 10^{-13}$ M de SAM-6. En otras realizaciones más, el anticuerpo presenta una afinidad de unión para LDL u oxLDL dentro de

aproximadamente 1-5.000 veces la afinidad de unión de SAM-6 o una afinidad de unión para LDL u oxLDL dentro de aproximadamente $KD 10^{-6}$ M a aproximadamente $KD 10^{-13}$ M de SAM-6.

5 Los anticuerpos de la invención son distintos de anticuerpo SAM-6. En una realización, un anticuerpo no presenta secuencias de cadena pesada y ligera idénticas a las secuencias de cadena pesada y ligera de SAM-6. En otra
 10 realización, un anticuerpo no presenta secuencias variables de cadena pesada o ligera idénticas a las secuencias variables de cadena pesada o ligera de SAM-6. En una realización más, un anticuerpo no presenta 90%-95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad para la secuencia de la región variable de cadena pesada o ligera de anticuerpo SAM-6. En una realización particular, un anticuerpo que es distinto de anticuerpo SAM-6 presenta una secuencia de
 15 cadena pesada con identidad del 100% para una secuencia de la región variable de cadena pesada o una CDR (CDR3; ARDLAVAGRPFDY; SEC ID N°: 17) dentro de una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada explicada como la SEC ID N°: 18.

Los anticuerpos de la invención incluyen IgG, IgA, IgM, IgE e IgD. En diversos aspectos, una IgG es una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

15 Los anticuerpos de la invención también incluyen subsecuencias de anticuerpos que se unen a Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R o una subsecuencia (por ej., fragmento inmunogénico) de los mismos. En diversos aspectos, una subsecuencia es un Fab, Fab', F(ab)₂, Fv, Fd, Fvs de una sola cadena (scFv), Fvs unido a disulfuro (sdFv), V_L o V_H.

20 Se describe además en la presente memoria un Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R y subsecuencias de los mismos, anticuerpos y subsecuencias que se unen a Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R que incluyen un dominio heterólogo. En una realización, un dominio heterólogo incluye una etiqueta detectable, marca o agente citotóxico. En aspectos particulares, una etiqueta detectable o marca es una enzima, sustrato de enzima, ligando, receptor, radionúclido, una marca T7, His, myc, HA o FLAG, reactivo de alta densidad electrónica, molécula de transferencia de energía, etiqueta paramagnética, fluoróforo, cromóforo, agente quimioluminiscente o un agente bioluminiscente.

25 Se describen además en la presente memoria estuches. En una realización, un estuche incluye un anticuerpo que se une a Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R e instrucciones para detectar Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R. En otra realización, un estuche incluye un anticuerpo que se une a Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R e instrucciones para tratar una afección tratable con un anticuerpo que se une para unirse a Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R. En realizaciones
 30 adicionales, un estuche también incluye un tratamiento anti-proliferativo celular o de activación inmunitaria o agente terapéutico o un agente anti-neoplásico, anti-cáncer o anti-tumor o un artículo de fabricación (por ej., para suministrar el anticuerpo, tratamiento o terapia anti-proliferación celular o de activación inmunitaria a un individuo de manera local, de manera regional o de manera sistémica). En aspectos particulares, las instrucciones son para tratar proliferación celular o hiperproliferación indeseable o tratar una neoplasia, tumor o cáncer. En aspectos adicionales,
 35 las instrucciones están en una etiqueta o inserto del envase.

La invención proporciona aún adicionalmente composiciones farmacéuticas. En una realización, una composición incluye Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En otra realización, una composición incluye un anticuerpo que se une específicamente a Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

40 Se describen en la presente memoria métodos para tratar un trastorno en un individuo con necesidad de tratamiento. En una realización, un método incluye administrar Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R o un anticuerpo que se une específicamente a Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R en una cantidad eficaz para tratar un trastorno hiperproliferativo celular en un individuo (por ej., una fase I, II, III, IV o V, neoplasia, tumor o cáncer, sólido o líquido, metastásico o no metastásico). En diversos aspectos, un trastorno hiperproliferativo celular afecta o está presente al menos en parte en: cerebro, cabeza o cuello, mama, esófago,
 45 boca, nasofaringe, nariz o senos nasales, estómago, duodeno, íleon, yeyuno, pulmón, hígado, páncreas, riñón, glándula suprarrenal, tiroides, vejiga, colon, recto, próstata, útero, cérvix, ovario, médula ósea, linfa, sangre, hueso, testículos, piel o músculo o sistema hematopoyético. En aspectos adicionales, un trastorno hiperproliferativo celular incluye una neoplasia, un tumor o cáncer que afecta o está presente al menos en parte en: mama, pulmón, tiroides,
 50 cabeza y cuello, nasofaringe, nariz o senos nasales, cerebro, columna vertebral, glándula suprarrenal, tiroides, linfa, tubo digestivo, boca, esófago, estómago, duodeno, íleon, yeyuno, intestino delgado, colon, recto, tracto génico-urinario, útero, ovario, cérvix, vejiga, testículo, pene, próstata, riñón, páncreas, glándula suprarrenal, hígado, hueso, médula ósea, linfa, sangre, músculo, piel o es hematopoyético. En aspectos particulares, una neoplasia, un tumor o cáncer es un sarcoma, carcinoma, adenocarcinoma, melanoma, mieloma, blastoma, glioma, linfoma leucemia. En
 55 aspectos particulares adicionales, una neoplasia, tumor o cáncer es un adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón, carcinoma gástrico difuso o intersticial, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma de próstata, carcinoma de esófago, carcinoma de mama, adenocarcinoma de páncreas, adenocarcinoma de ovario o adenocarcinoma uterino. En más aspectos particulares, una neoplasia, tumor o cáncer empeora de manera progresiva o está en remisión. En más aspectos adicionales, el tratamiento da como resultado aliviar o mejorar uno o más síntomas físicos adversos asociados a un trastorno hiperproliferativo celular o una neoplasia, tumor o cáncer o reduce o
 60

disminuye el volumen de la neoplasia, tumor o cáncer, inhibe o evita un incremento en el volumen de la neoplasia, tumor o cáncer, inhibe la neoplasia, progresión o empeoramiento del tumor o cáncer, estimula la lisis o muerte celular programada de células de neoplasia, tumor o cáncer o inhibe, reduce o disminuye la proliferación o metástasis de la neoplasia, tumor o cáncer o prolonga o extiende la vida del individuo o mejora la calidad de vida del individuo.

5 Los métodos incluyen la administración al individuo de manera local, de manera regional o de manera sistémica. Los individuos ejemplares (por ej., mamíferos tales como seres humanos) incluyen candidatos para, y los que experimentan, o que han experimentado un trastorno anti-proliferativo celular o anti-hiperproliferativo celular (por ej., anti-neoplásico, anti-tumor, anti-cáncer o anti-metástasis) o tratamiento o terapia de activación inmunitaria.

10 La invención también proporciona aún métodos combinados para tratar un trastorno en un individuo con necesidad de tratamiento. En una realización, se reivindica la glucoproteína de SAM-6/R o un anticuerpo que se une específicamente a Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R para uso en un tratamiento o terapia anti-proliferativo celular o de activación inmunitaria a un individuo (por ej., previamente a, sustancialmente de manera contemporánea con o después uno de otro). En diversos aspectos, un tratamiento o terapia anti-proliferativa celular o de activación inmunitaria incluye resección quirúrgica, radioterapia, terapia con radiación, quimioterapia, inmunoterapia, hipertermia, un agente alquilante, anti-metabolito, extracto de planta, alcaloide de plantas, nitrosourea, hormona, análogo de nucleósido o nucleótido, un linfocito, célula plasmática, macrófago, célula dendrítica, célula NK o célula B, un anticuerpo, un factor de crecimiento celular, un factor de supervivencia celular, un factor de diferenciación celular, una citocina o una quimiocina.

20 La invención proporciona aún adicionalmente tratar un trastorno o enfermedad asociada a o producida por niveles de LDL u oxLDL no deseables o excesivos. En una realización, un método incluye administrar a un individuo un anticuerpo que se une específicamente a Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R en una cantidad eficaz para tratar el trastorno o la enfermedad asociada a o producida por niveles de LDL u oxLDL no deseables o excesivos en el individuo. En diversos aspectos, un trastorno o una enfermedad asociada a o producida por niveles de LDL u oxLDL no deseables o excesivos es: hiperlipidemia, hipercolesterolemia, arteriosclerosis, enfermedad cardiovascular, cardiopatía (CHD), apoplejía, glomerulonecrosis, tensión arterial alta o diabetes.

25 Se describen además métodos para detectar o investigar Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R. En una realización, un método incluye poner en contacto un material o muestra biológica con un anticuerpo que se une específicamente a Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R en condiciones que permiten la unión del anticuerpo al Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R y que ensaya la unión del anticuerpo a Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R. La unión del anticuerpo a Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R detecta la presencia de Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R. En un aspecto, el Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R está presente en una célula o tejido. En otro aspecto, el material o muestra biológica se obtiene de un individuo mamífero.

30 También se describen métodos para diagnosticar a un individuo que tiene o está en riesgo aumentado de tener un trastorno hiperproliferativo celular (por ej., neoplasia, tumor o cáncer o metástasis). En una realización, un método incluye proporcionar un material o muestra biológica de un individuo, poner en contacto el material o muestra biológica con un anticuerpo que se une específicamente a Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R en condiciones que permiten la unión del anticuerpo a Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R y ensayar la unión del anticuerpo a Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R. La unión del anticuerpo al polipéptido diagnostica que el individuo tiene o presenta riesgo aumentado de tener una neoplasia, tumor o cáncer o metástasis. En un aspecto, el material o muestra biológica se obtiene de un ser humano. En aspectos adicionales, el material o muestra biológica comprende una biopsia, tal como una biopsia de pulmón, páncreas, estómago, mama, esófago, ovario o uterina.

40 La invención proporciona adicionalmente métodos para producir un anticuerpo que se une específicamente a Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R. En una realización, un método incluye administrar Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R o un fragmento de los mismos, a un animal, investigar en el animal la expresión de un anticuerpo que se une a Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R o el fragmento de los mismos, seleccionar un animal que produzca un anticuerpo que se una a Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R o el fragmento de los mismos y aislar el anticuerpo del animal seleccionado. En otra realización, un método incluye administrar Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R o un fragmento de los mismos a un animal capaz de expresar una inmunoglobulina humana, aislar células de bazo de un animal que produzca anticuerpo que se una a Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R o el fragmento de los mismos, fusionar las células del bazo con una célula de mieloma para producir un hibridoma e investigar en el hibridoma la expresión de un anticuerpo humano que se una al polipéptido o el fragmento de los mismos. En aspectos particulares, el fragmento de Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R incluye una porción de la secuencia de polipéptidos con un resto de carbohidrato unido a N u O.

Descripción de los dibujos

- Figura 1:** ruta lipoptótica de SAM-6.
- Figura 2:** diana de SAM-6.
- Figura 3:** Método Western representativo de SAM-6 y control de IgM no relacionada en extractos de membrana.
- 5 **Figura 4:** Cromatograma después de cromatografía de exclusión por tamaños.
- Figura 5:** Análisis por método Western de fracciones positivas de SAM-6 después de cromatografía de exclusión por tamaños.
- Figura 6:** Tinción de Coomassie de gel SDS-Page después de cromatografía de exclusión por tamaños.
- Figura 7:** Cromatograma después de cromatografía de intercambio iónico.
- 10 **Figura 8:** Análisis por método Western de fracciones positivas de SAM-6 después de cromatografía de intercambio iónico.
- Figura 9:** Tinción con Azul de Coomassie después de cromatografía de intercambio iónico.
- Figura 10:** Mapa de masa peptídica de proteína de 80 kDa aislada obtenida por análisis de espectrometría de masas MALDI.
- 15 **Figura 11:** Alineación de secuencias peptídicas determinadas de manera experimental asignada a Grp78 humana y la secuencia de proteínas de Grp78 /BiP humana [NP_005338].
- Figura 12:** Análisis FACS de unión de SAM-6 en células BXPC-3 transfectadas con Grp78-ARNsi.
- Figura 13:** Análisis de unión de SAM-6 en células BXPC-3 transfectadas con Grp78-ARNsi. Se muestran los porcentajes de células positivas para antígenos superficiales de SAM-6 y los controles (Grp78 y CD55).
- 20 **Figura 14:** ELISA de Muerte Celular con células BXPC-3 transfectadas con Grp78-ARNsi.
- Figura 15:** Análisis por método Western: Unión de anticuerpo SAM-6 en extractos de membrana de estirpe celular BXPC-3 de carcinoma de páncreas.
- Figura 16:** Unión de SAM-6 en células de cáncer de páncreas después de tratamiento con glucosidasas.
- Figura 17:** Inmunofluorescencia de endocitosis de SAM-6.
- 25 **Figura 18:** Tinción con Sudán III de células de cáncer de páncreas inducido por anticuerpos (BXPC-3).
- Figura 19:** Análisis de muerte celular programada inducida por SAM-6 por medición de liberación de Citocromo C.
- Figura 20:** Análisis de muerte celular programada inducida por SAM-6 por medición de activación de caspasas -8, -9, -3 y -6.
- 30 **Figura 21:** Inhibición dependiente de la dosis de SAM-6 de crecimiento de xenoinjerto de tumor de carcinoma de estómago.

Descripción detallada

La invención se basa, al menos en parte, en una glucoproteína, referida como Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R. La glucoproteína de SAM-6/R presenta un peso molecular aparente en un intervalo de aproximadamente 80-82 kilodaltons (KDa), cuando se determina por electroforesis en gel desnaturalizante. Una característica ejemplar no limitante de glucoproteína de SAM-6/R es la unión de al menos un resto carbohidrato unido a nitrógeno (N) u oxígeno (O) que es distinto de Grp78. Otra característica ejemplar no limitante de la glucoproteína de SAM-6/R es que un anticuerpo indicado SAM-6 se une específicamente a glucoproteína de SAM-6/R.

Según la invención, se proporciona glucoproteína aislada o purificada indicada como Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R, con un peso molecular aparente en un intervalo de aproximadamente 80-82 kilodaltons (KDa), cuando se determina por electroforesis en gel desnaturalizante. En una realización, una glucoproteína de SAM-6/R presenta al menos un resto carbohidrato unido a nitrógeno (N)- u oxígeno (O) distinto de Grp78. En otra realización, un anticuerpo indicado SAM-6 se une específicamente a una glucoproteína SAM-6/R.

El análisis de la secuencia de glucoproteína de SAM-6/R reveló la identidad de la secuencia con proteína 78 (Grp78) reguladora de glucosa (o regulada), también conocida y referida como BiP, Hspa5, proteína 5 de 70 KDa de Choque

térmico y Hsce70. La secuencia de Grp78/BiP humana es como se explica en la Figura 11 (SEC ID N°: 1). Las secuencias de glucoproteína de SAM-6/R que parecen idénticas a la secuencia Grp78/BiP se indican en tipo de letra negrita. Así otra característica ejemplar no limitante de la glucoproteína de SAM-6/R es al menos homología/identidad de la secuencia al menos parcial con Grp78.

5 Según la invención, se proporcionan glucoproteínas aisladas o purificadas indicadas como Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R, con un peso molecular aparente en un intervalo de aproximadamente 80-82 kilodaltons (kDa), cuando se determina por electroforesis en gel desnaturalizante. En una realización, la glucoproteína de SAM-6/R presenta homología de la secuencia de polipéptidos a Grp78, como se explica en la SEC ID N°: 1.

10 En diversos aspectos no limitantes, una glucoproteína de SAM-6/R comprende una secuencia de aproximadamente 655 aminoácidos; presenta un dominio transmembrana de aproximadamente 17 aminoácidos; presenta un dominio extracelular de aproximadamente 220 aminoácidos o presenta un dominio intracelular de aproximadamente 411 aminoácidos. En otros aspectos no limitantes, la glucoproteína de SAM-6/R presenta un resto carbohidrato unido a un aminoácido, por ejemplo, un resto asparagina, serina o treonina de (por ej., como en la SEC ID N°: 1). Los sitios de O-glucosilación potenciales de glucoproteína de SAM-6/R se indican por los restos treonina (T) subrayados en la SEC ID N°: 1.

Como se usa en la presente memoria, el término "glucoproteína" se refiere a una proteína, polipéptido o péptido que presenta al menos un resto azúcar unido de manera covalente a un aminoácido que comprende la proteína. Un "resto carbohidrato" se refiere a dos o más restos azúcar, *por ej.*, mono-, di-, tri-sacáridos, etc. Los términos oligosacárido y polisacárido son sinónimos con el término carbohidrato.

Los azúcares, carbohidratos, oligosacáridos y polisacáridos se unen típicamente a restos aminoácido mediante un enlace glucosídico. Para las eucariotas, tiene lugar una serie de adiciones y eliminaciones de azúcar de manera post-traducciona para formar el resto carbohidrato de la glucoproteína. Los azúcares ejemplares incluyen uno o más de: galactosa, acetilgalactosa, manosa, fucosa, glucosa, acetilglucosa, ácido siálico, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina y ácidos neurámicos. Una glucoproteína de SAM-6/R presenta opcionalmente uno o más de dichos azúcares particulares unidos vía una unión de N u O a un resto serina, treonina o asparagina, por ejemplo.

El contacto de la glucoproteína de SAM-6/R con una enzima de glucosidasa puede reducir el peso molecular aparente de la glucoproteína de SAM-6/R debido a eliminación de uno o más restos azúcar que comprenden el resto carbohidrato. En una realización, el contacto de la glucoproteína de SAM-6/R con una enzima de glucosidasa reduce el peso molecular aparente por aproximadamente 1-10 kilodaltons (kDa), por ejemplo, de aproximadamente 82 kDa a 72 kDa. En otra realización, el contacto de la glucoproteína de SAM-6/R con una O-glucosidasa reduce el peso molecular aparente de la glucoproteína de SAM-6/R. Por supuesto, el experto reconocerá que la cantidad y el tipo, si hay, de carbohidrato que se puede eliminar de la glucoproteína de SAM-6/R dependerán de la selección de una enzima glucosidasa particular, que a su vez afectará a la reducción, si hay, en el peso molecular aparente de la glucoproteína de SAM-6/R.

Las glucosidasas capaces de eliminar uno o más azúcares de un resto carbohidrato o la estructura del carbohidrato completa, incluyen O-glucosidasas, que típicamente escinden azúcares que comprenden restos carbohidrato unidos al oxígeno (O) de los restos serina o treonina y N-glucosidasas, que típicamente escinden azúcares que comprenden restos carbohidrato unidos al nitrógeno (N) de restos asparagina. Los ejemplos particulares de tales glucosidasas son: O-glucosidasa, N-glucosidasa F, endoglucosidasa H (endo H), neuraminidasa y fucosidasas. La O-glucosidasa escinde oligosacárido unido a serina o treonina. La N-glucosidasa F escinde N-glicanos unidos a asparagina cuando el oligosacárido presenta una longitud mínima de la unidad de núcleo de quitobiosa. Endo H es una glucosidasa que se escinde dentro del núcleo de quitobiosa de alta manosa y algunos oligosacáridos híbridos de glucoproteínas unidas a N. La neuraminidasa elimina restos acilneuramínicos terminales. Las fucosidasas eliminan fucosa, por ejemplo, de lactosa y carbohidratos complejos. Dichas glucosidasas presentan típicamente al menos alguna especificidad en términos de las uniones azúcar escindidas y si los restos carbohidrato están unidos a O o N y se pueden usar, por lo tanto, para caracterizar la composición y estructura del resto o de los restos carbohidrato de la glucoproteína de SAM-6/R.

Se investigó un panel de carbohidratos por la unión de anticuerpo SAM-6. En particular, se investigó para los (GlcNAc)₂, Man₃, sTn, GM₄, Lac-di-Nac, β-D-galactosa-3-sulfato, H tipo 3, Neu5Ac6Gal, GlcNAcβ3Gal, ácido α-N-acetilneuramínico, 3'-SL, Atri, Tk, 3'SLN, sLe^a, Btri, GA1 Pk, Gb₃, sLe^x, Adi, A tipo 2, Tαβ, 6'-SL, Bdi, B tipo 2, Galβ3Gal, Tββ, H tipo 2, Gala1-3'Lac, Le^a 3'-O-su-Le^a, 6'-O-su-LacNAc, GlcNAcβ1-2TF, Le^b, 3'-O-su-Le^x, Hdi, Galα4GlcNAc, Le^d (H tipo 1), 3'-su-LacNAc, 3'-O-su-TF, ácido β-N-acetilneuramínico, Le^c, 3'-su-Le^c, GlcNAcβ1-3'LacNAc, maltosa, Le^x, melibiosa, di-GalNAcβ, α-D-glucosa, Le^y, Galα1-3'LacNAc, 3'-SiaTF, β-D-glucosa, Lac, GlcNAcα1-3'TF, núcleo 3, α-D-galactosa, LacNAc, (Sia)₂, núcleo 6, β-D-galactosa, TF, (Sia)₃, núcleo 4, α-D-manosa, Fucα3GlcNAc, GlcNAcβ1-3'TF, 3,6-SiaTF, α-D-manosa-6-fosfato, Fucα4GlcNAc Le, Gal2βGal, 6-SiaTF, α-L-fucosa, Fs-2, 6-O-su-LacNAc, YDS, β-N-acetil-D-glucosamina, núcleo 5, núcleo 2, 9-OS, α-N-acetil-D-galactosamina (Tn), Tαα, H tipo 4, 7-OS, β-N-acetil-D-galactosamina, 3'-SiaLe^c, LNT, 3,6-SiaTn, β-N-acetil-D-glucosamina-6-sulfato, Galα2Gal, LNnT y 3-SiaTn la unión a anticuerpo SAM-6. No se unió de manera detectable anticuerpo SAM-6 a ninguno de estos carbohidratos. Por consiguiente, un anticuerpo SAM-6 de la invención incluye anticuerpos que se

unen a una glucoproteína de SAM-6/R pero no a uno o más de los carbohidratos mencionados.

5 En realizaciones en que el anticuerpo indicado SAM-6 se une específicamente a la glucoproteína de SAM-6/R, el anticuerpo SAM-6 se une a al menos una porción de la glucoproteína de SAM-6/R que comprende un resto carbohidrato (por ej., un resto carbohidrato unido a N u O). El tratamiento de glucoproteína de SAM-6/R con una enzima O-glucosidasa redujo la unión de anticuerpo SAM-6 a la glucoproteína, presumiblemente debido a eliminación de uno, varios o todos los azúcares que comprenden un epítipo de unión a anticuerpo SAM-6 (Figura 16). El tratamiento de glucoproteína de SAM-6/R con una enzima N-glucosidasa F no destruyó la unión de anticuerpo SAM-6 a la glucoproteína (Figura 16). Así, la unión de anticuerpo SAM-6 a glucoproteína de SAM-6/R parece que requiere o que está mediado por un resto carbohidrato unido a O y no un resto carbohidrato unido a N. De acuerdo con esto, unir SAM-6 a SAM-6/R puede requerir o estar mediado por, al menos en parte, uno o más azúcares que comprenden un resto carbohidrato unido a O de una glucoproteína SAM-6/R, mientras la unión de SAM-6 a SAM-6/R no parece que requiera un resto carbohidrato unido a N de una glucoproteína SAM-6/R.

15 El término "SAM-6" o "anticuerpo SAM-6" se refiere a un anticuerpo de IgM humana con una secuencia de la región variable de cadena ligera (SEC ID N°: 13) y una secuencia de la región variable de cadena pesada (SEC ID N°: 15). "SAM-6" o "anticuerpo SAM-6" se une específicamente a glucoproteína de SAM-6/R. SAM-6 parece que se une a una región de la glucoproteína de SAM-6/R que incluye un resto carbohidrato unido a O o se une al propio resto carbohidrato unido a O, como se indica por unión reducida de SAM-6 a glucoproteína de SAM-6/R observada después de tratamiento de glucoproteína de SAM-6/R con una O-glucosidasa. No parece que se una SAM-6 a una región de la glucoproteína de SAM-6/R que incluya un resto carbohidrato unido a N, como se indica por la unión de SAM-6 mantenida a glucoproteína de SAM-6/R después de tratamiento de glucoproteína de SAM-6/R con N-glucosidasa F. También se ha mostrado que SAM-6 se une a una lipoproteína de baja densidad (LDL u oxLDL).

Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de regiones variables de cadena ligera y pesada de SAM-6, con las regiones de determinación complementaria (CDR1-CDR3) indicadas, son como sigue.

Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (V_L) de anticuerpo SAM-6

(SEC ID N° 13): Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val
 Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala SerIle Thr Cys
 Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Cys
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val
 Leu Val Ile Tyr Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
 Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr
 Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln
 25 Ala Trp Asp Ser Ser Ile Val Val

Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera (V_L) de anticuerpo SAM-6 (SEC ID N°: 14):

ES 2 476 798 T3

tcc	tat	gtg	ctg	act	cag	cca	ccc	tca	gtg	tcc	gtg	tcc	cca	gga	45
Ser	Tyr	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	
1				5					10					15	
CDR1															
cag	aca	gcc	agc	atc	acc	tgc	tct	gga	gat	aaa	ttg	ggg	gat	aaa	90
Gln	Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Asp	Lys	Leu	Gly	Asp	Lys	
				20					25					30	
tat	gct	tgc	tgg	tat	cag	cag	aag	cca	ggc	cag	tcc	cct	gtg	ctg	135
Tyr	Ala	Cys	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Leu	
				35					40					45	
CDR2															
gtc	atc	tat	caa	gat	agc	aag	cgg	ccc	tca	ggg	atc	cct	gag	cga	180
Val	Ile	Tyr	Gln	Asp	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	
				50					55					60	
ttc	tct	ggc	tcc	aac	tct	ggg	aac	aca	gcc	act	ctg	acc	atc	agc	225
Phe	Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	
				65					70					75	
ggg	acc	cag	gct	atg	gat	gag	gct	gac	tat	tac	tgt	cag	gcg	tgg	270
Gly	Thr	Gln	Ala	Met	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ala	Trp	
				80					85					90	
CDR3															
gac	agc	agc	att	gtg	gta										288
Asp	Ser	Ser	Ile	Val	Val										
				95											

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (V_H) de anticuerpo SAM-6

(SEC ID N° 15):	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	
	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser
	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
	Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Glu	Ala	Pro	Gly	Lys
	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Asp
	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys
	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg
	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
	Asp	Arg	Leu	Ala	Val	Ala	Gly	Lys	Thr	Phe	Asp
	Tyr										

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada (V_H) de anticuerpo SAM-6 (SEC ID N°: 16):

cag	gtg	cag	ctg	gtg	gag	tct	ggg	gga	ggc	gtg	gtc	cag	cct	ggg	45
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	
1				5					10					15	
agg	tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	gga	ttc	acc	ttc	agt	90
Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	
				20					25					30	
CDR1															
agc	tat	gct	atg	cac	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	ggc	aag	ggg	ctg	135
Ser	Tyr	Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Glu	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	
				35					40					45	
CDR2															
gag	tgg	gtg	gca	gtt	ata	tca	tat	gat	gga	agc	aat	aaa	tac	tac	180
Glu	Trp	Val	Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	
				50					55					60	
gca	gac	tcc	gtg	aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aat	tcc	225
Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	
				65					70					75	
aag	aac	acg	ctg	tat	ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aga	gct	gag	gac	270
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	
				80					85					90	
CDR3															
acg	gct	gtg	tat	tac	tgt	gcg	aga	gat	cgg	tta	gca	gtg	gct	ggt	315
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Arg	Leu	Ala	Val	Ala	Gly	
							15								
					95					100				105	
CDR3															
aaa	act	ttt	gac	tac											
Lys	Thr	Phe	Asp	Tyr											
					110										

5 En algunas realizaciones, la glucoproteína de SAM-6/R se caracteriza como que se expresa en una célula hiperproliferativa, tal como una célula neoplásica, cancerígena o tumoral. Ejemplos no limitantes de células neoplásicas, cancerígenas y tumorales en que se ha detectado glucoproteína de SAM-6/R incluyen, por ejemplo, esófago, estómago, mama, pulmón, colon, páncreas, próstata, útero y ovario. En más aspectos particulares, la glucoproteína de SAM-6/R se caracteriza como que se expresa en estirpes celulares tumorales indicadas como BXPC-3 (Depósito ATCC N° CRL-1687; Apartado de Correos 1549 Manassas, VA, 20.108, EE.UU.) y 23.132/87 (Depósito DSMZ N° ACC 201; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares), Inhoffenstrase 7 B 38124 Braunschweig, Alemania).

10 Según la invención, se proporciona glucoproteína aislada o purificada indicada como Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R, con un peso molecular aparente en un intervalo de aproximadamente 80-82 kilodaltons (KDa), cuando se determina por electroforesis en gel desnaturalizante 80%, 90%, 95% o más de identidad con SEC ID N°: 1 o cualquier valor o intervalo numérico. En una realización, la glucoproteína de SAM-6/R presenta una secuencia de polipéptidos idéntica a todo o a una parte de la secuencia Grp78, como se explica en la SEC ID N°: 1. En aspectos particulares, la glucoproteína de SAM-6/R presenta una secuencia de polipéptidos idéntica en todo o en una parte de una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos (SEC ID Nos: 2-12):

NGRVEIANDQGNRITPSYVAFTPEGER;

NQLTSNPENTVFDAGR;

TWNDSVQQDIKFLPFKVVVEKTKPYIQVDIGGGQTKTFAPEEISAMVLTK;

KVTHAVVTVPAYFNDAQRQATKDAGTIAGLNVMR; VMEHFIK;

AKFEELNMDLFRSTMKPVQKVLSDSLK; EFFNGKEPSR;

VYEGERPLTKDNHLLGTFDLTGIPPAPR; LTPEEIER; IDTRNELESYAYSLK o

LYGSAGPPPTGEEDTAEKDEL.

En otra realización, la glucoproteína de SAM-6/R presenta un resto carbohidrato unido a la misma que es distinto de un resto carbohidrato de Grp78. En aspectos particulares, el resto carbohidrato es un resto unido a N o unido a O.

5 Los términos "idéntico" o "identidad," significan que dos o más entidades referenciadas son iguales. Así, en el caso de que sean idénticas dos secuencias de proteínas, tienen la misma secuencia de aminoácidos, al menos dentro de la región o porción referenciada. En el caso de que dos secuencias de ácidos nucleicos sean idénticas, tienen la misma secuencia de polinucleótidos, al menos dentro de la región o porción referenciada. Un "área de identidad" se refiere a una porción de dos o más entidades referenciadas que son iguales. Así, en el caso de que dos secuencias de proteínas o ácidos nucleicos sean idénticas por una o más regiones de la secuencia comparten identidad dentro de esa región.

10 Los términos "homólogo" u "homología" significan que dos o más entidades referenciadas comparten al menos identidad parcial por una región o porción proporcionada. "Homología sustancial" significa que una molécula se conserva de manera estructural o de manera funcional de manera que presente o se prevea que presente estructura o función al menos parcial de una o más de las estructuras o funciones (por ej., una función biológica) de la molécula de referencia o región o porción pertinente/correspondiente de la molécula de referencia con que comparte homología. La homología ejemplar son polipéptidos con secuencias de aminoácidos con 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o más de identidad de secuencia con un polipéptido de referencia. Un polipéptido con homología sustancial presenta o se prevé que presente actividad al menos parcial como el polipéptido de referencia. Por ejemplo, en una realización particular, una glucoproteína de SAM-6/R con una o más modificaciones (por ej., sustituciones, supresiones o adiciones de resto carbohidrato o aminoácido) que retiene al menos unión parcial a SAM-6 se considera que tiene homología sustancial con glucoproteína de SAM-6/R.

15 Los términos "proteína," "polipéptido" y "péptido" se usan de manera indistinta en la presente memoria para referirse a dos o más aminoácidos o "restos," unidos mediante enlaces covalentes por un enlace amida o equivalente. Los polipéptidos pueden tener diversas longitudes y los aminoácidos se pueden unir por enlaces químicos no naturales y no amida incluyendo, por ejemplo, los formados con glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, maleimidias bifuncionales o N, N'-diciohexilcarbodiimida (DCC). Los enlaces no amida incluyen, por ejemplo, cetometileno, aminometileno, olefina, éter, tioéter y similares (véase, *por ej.*, Spatola en Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, págs 267-357 (1.983), "Peptide and Backbone Modifications," Marcel Decker, NY).

20 El término "aislado" usado como modificador de una composición significa que la composición se hace por la mano del hombre o se separa de otro u otros componentes más en su entorno *in vivo* que se encuentra en la naturaleza. En general, las composiciones así separadas están sustancialmente exentas de uno o más materiales con que normalmente se asocian por naturaleza, por ejemplo, una o más proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, membranas celulares. Así, se separa sustancialmente una composición aislada de otros componentes biológicos en la célula del organismo en que la composición tiene lugar de manera natural o del medio artificial en que se produce (por ej., de manera sintética o por cultivo celular). Por ejemplo, un polipéptido aislado se separa sustancialmente de otros polipéptidos y ácido nucleico y no incluye una biblioteca de polipéptidos o polinucleótidos presentes entre millones de secuencias de polipéptidos o ácidos nucleicos, tales como una biblioteca de polipéptidos, genómica o de ADNc, por ejemplo. Un ácido nucleico aislado se separa sustancialmente de otros polipéptidos y ácido nucleico y no incluye una biblioteca de polipéptidos o polinucleótidos presente entre millones de secuencias de polipéptidos o ácidos nucleicos, tal como una biblioteca de polipéptidos, genómica o de ADNc, por ejemplo. El término "aislado" no excluye formas físicas alternativas de la composición, por ejemplo, una proteína aislada podía incluir multímeros de proteínas, modificaciones post-traduccionales (por ej., glucosilación, fosforilación) o formas derivatizadas.

25 El término "purificado" usado como modificador de una composición se refiere a una composición exenta de la mayoría o todos los materiales con que típicamente se asocia por naturaleza. Así, se considera que una proteína separada de las células está sustancialmente purificada cuando se separa de los componentes celulares por métodos clásicos mientras se considera que una secuencia de ácidos nucleicos sintetizada de manera química está sustancialmente purificada cuando se separa de sus precursores químicos. Purificado, por lo tanto, no requiere pureza absoluta. Además, una composición "purificada" se puede combinar con otra u otras moléculas más. Así, el término "purificado" no excluye combinaciones de composiciones.

30 Proteínas y ácido nucleico "purificados" incluyen proteínas y ácidos nucleicos producidos por métodos de

purificación clásicos. El término también incluye proteínas y ácidos nucleicos producidos por expresión recombinante en una célula hospedadora así como síntesis química. "Purificado" también se puede referir a una composición en que el nivel de contaminantes está por debajo de un nivel que es aceptable para una agencia reguladora para administración a un ser humano o animal no humano, por ejemplo, la administración de Medicamentos y Alimentos (FDA).

La pureza sustancial puede ser al menos aproximadamente 60% o más de la molécula en masa. La pureza también puede ser aproximadamente 70% u 80% o más y puede ser mayor, por ejemplo, 90% o más. La pureza puede ser menor, por ejemplo, en un portador farmacéutico la cantidad de una molécula en % en peso puede ser menor que 60% pero la proporción relativa de la molécula comparado con otros componentes con que se asocia normalmente será mayor. La pureza se puede determinar por cualquier método apropiado, incluyendo, por ejemplo, espectroscopía UV, cromatografía (por ej., HPLC, fase gas), electroforesis de gel (por ej., tinción con plata o coomassie) y el análisis de la secuencia (péptido y ácido nucleico).

La glucoproteína de SAM-6/R se expresa en células neoplásicas, tumorales y cancerígenas, malignas y no malignas. Por ejemplo, la glucoproteína de SAM-6/R se expresa en tejido gástrico maligno y no maligno, carcinoma escamoso de pulmón, adenocarcinoma de pulmón, melanomas y células cancerígenas nasales.

La glucoproteína de SAM-6/R también se expresa en tumores en diversas fases y grados. Por ejemplo, la glucoproteína de SAM-6/R se detectó en todas las fases IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB y IV y los grados G1, G2 y G3, de carcinoma escamoso de pulmón y adenocarcinoma.

La glucoproteína de SAM-6/R se expresa adicionalmente en metástasis de tumores. Por ejemplo, se detectó glucoproteína de SAM-6/R en carcinoma escamoso de pulmón y metástasis de adenocarcinoma a ganglio linfático y cerebro; se detectó glucoproteína de SAM-6/R en metástasis de cáncer de mama (ductal invasivo) a ganglio linfático; se detectó glucoproteína de SAM-6/R en metástasis de adenocarcinoma de colon para hígado y ganglio linfático; se detectó glucoproteína de SAM-6/R en metástasis de adenocarcinoma de estómago (intestinal y difuso) para ganglio linfático; se detectó glucoproteína de SAM-6/R en metástasis de adenocarcinoma de páncreas para ganglio linfático; se detectó glucoproteína de SAM-6/R en metástasis de carcinoma escamoso de cabeza y cuello para ganglio linfático y se detectó glucoproteína de SAM-6/R en metástasis de melanoma para recto, esófago, piel, glándula parótida, colon, glándula suprarrenal y epitelio nasal.

La glucoproteína de SAM-6/R se expresa además en estirpes celulares tumorales. Por ejemplo, la glucoproteína de SAM-6/R se expresa en la estirpe celular tumoral indicada como BXP-3 (Depósito ATCC N° CRL-1687; Apartado de correos 1549 Manassas, VA, 20.108, USA) 23132/87 (Depósito DSMZ N° ACC 201; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares), Inhoffenstrasse 7 B 38124 Braunschweig, Alemania) estirpes celulares de melanoma CRL1424 y HTB-69 y células cancerígenas nasales (RPMI2650). La glucoproteína de SAM-6/R aislada o purificada se puede obtener de estos tumores, metástasis, estirpes celulares y otras células (aislados primarios o estirpes celulares transmitidas o inmortalizadas) usando los métodos de purificación descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica.

Según la invención, se proporcionan anticuerpos que se unen específicamente a glucoproteína de SAM-6/R y subsecuencias inmunogénicas de glucoproteína de SAM-6/R, así como células que expresan glucoproteína de SAM-6/R. Dichos anticuerpos de glucoproteína de SAM-6/R incluyen anticuerpos que se unen específicamente a glucoproteína de SAM-6/R, anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo que incluye un resto carbohidrato unido a glucoproteína de SAM-6/R y anticuerpos que se unen específicamente a un resto carbohidrato unido a glucoproteína de SAM-6/R.

La glucoproteína de SAM-6/R no se expresa típicamente en células no cancerígenas. Por ejemplo, la glucoproteína de SAM-6/R no se detectó en tejido humano normal congelado fresco (estándar de la FDA) de glándula suprarrenal, cerebelo, cerebro, glándula pituitaria, mama, colon, esófago, corazón, riñón, hígado, pulmón, músculo esquelético, mesotelio, nervio periférico, nervio ciático, nervio trigeminal, ovario, páncreas, placenta, próstata, glándula salival, piel, intestino delgado, bazo, estómago, testículo, timo, tiroides, amígdalas, útero, cervix o médula ósea. La glucoproteína de SAM-6/R tampoco se detectó en linfocitos, granulocitos, fibroblastos humanos y células nasales normales (HNEPC). Así, no se espera que los anticuerpos que se unen específicamente a glucoproteína de SAM-6/R se unan a uno o más de los tipos de tejido humano normales anteriores, células derivadas o que se consideren representativas de dichos tipos de tejido humano normales, ni linfocitos, granulocitos, fibroblastos humanos o células nasales normales (HNEPC).

Los anticuerpos que se unen específicamente a glucoproteína de SAM-6/R incluyen anticuerpos aislados, anticuerpos purificados y subsecuencias de anticuerpos. En una realización, se proporciona un anticuerpo que se une al dominio extracelular de la glucoproteína SAM-6/R. En otra realización, se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo que comprende al menos un resto carbohidrato unido a N u O de glucoproteína de SAM-6/R. En una realización más, se proporciona un anticuerpo que se une a un resto carbohidrato unido a glucoproteína de SAM-6/R que es distinto de Grp78. En una realización adicional, se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a glucoproteína de SAM-6/R, pero presenta unión reducida después de que la glucoproteína de SAM-6/R se pone en contacto con una glucosidasa. En un aspecto, el tratamiento de la O-glucosidasa de

(por ej., las fases IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB o IV) o el grado (por ej., los grados G1, G2 o G3), melanomas y células cancerígenas nasales. Las células no limitantes adicionales que expresan glucoproteína de SAM-6/R a que se unen los anticuerpos incluyen metástasis de tumores, tales como carcinoma escamoso de pulmón y metástasis de adenocarcinoma a ganglio linfático y cerebro; metástasis de cáncer de mama (ductal invasivo) a ganglio linfático; metástasis de adenocarcinoma de colon a hígado y ganglio linfático; se detectó glucoproteína de SAM-6/R en metástasis de adenocarcinoma de estómago (intestinal y difuso) a ganglio linfático; metástasis de adenocarcinoma de páncreas a ganglio linfático; metástasis de carcinoma escamoso de cabeza y cuello a ganglio linfático y metástasis de melanoma a recto, esófago, piel, glándula parótida, colon, glándula suprarrenal y epitelio nasal.

Las células no limitantes adicionales que expresan glucoproteína de SAM-6/R a que se unen los anticuerpos incluyen estirpes celulares de tumores, tales como BXPC-3 (Depósito ATCC N° CRL-1687; Apartado de correos 1549 Manassas, VA, 20108, USA), 23132/87 (Depósito DSMZ N° ACC 201; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares), Inhoffenstrasse 7 B 38124 Braunschweig, Alemania), células de melanoma CRL1424 y HTB-69 y células cancerígenas nasales RPMI2650.

Así, en realizaciones adicionales, la unión de anticuerpo de glucoproteína de SAM-6/R a una célula neoplásica, tumoral o cancerígena, o de metástasis que expresa glucoproteína de SAM-6/R inhibe, disminuye o reduce el crecimiento o la proliferación celular o estimula o induce la muerte celular, lisis o muerte celular programada. En otra realización más, la unión de anticuerpo de glucoproteína de SAM-6/R a células BXPC-3, 23132/87, CRL1424, HTB-69 o RPMI2650 inhibe, disminuye o reduce el crecimiento o la proliferación celular de BXPC-3, 23132/87, CRL1424, HTB-69 o RPMI2650 o estimula o induce la muerte celular, lisis o muerte celular programada de BXPC-3, 23132/87, CRL1424, HTB-69 o RPMI2650. En aspectos particulares, el crecimiento o la proliferación celular se inhibe, disminuye o reduce al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75% o más con respecto a una célula de control (no tratada) o cualquier valor o intervalo numérico dentro de o incluyendo dichos valores porcentuales. En más aspectos particulares, la muerte celular, lisis o muerte celular programada es al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75% o más con respecto a una célula de control (no tratada) o cualquier valor o intervalo numérico dentro de o incluyendo dichos valores porcentuales. En aún una realización más, la unión del anticuerpo a células que expresan la glucoproteína produce la activación de una caspasa (por ej., caspasa-3, caspasa-8 o caspasa-9).

Los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales. El término "monoclonal," cuando se usa con referencia a un anticuerpo se refiere a un anticuerpo que se basa en, se obtiene de o procede de un solo clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o de fago. Un anticuerpo "monoclonal" se define, por lo tanto, en la presente memoria de manera estructural y no el método por el que se produce.

Los anticuerpos de la invención pueden pertenecer a cualquier clase de anticuerpo, IgM, IgG, IgE, IgA, IgD o subclase. Las subclases ejemplares para IgG son IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄.

Los anticuerpos de la invención pueden presentar secuencias de cadena ligera kappa o lambda, cualquier longitud completa como en anticuerpos que se encuentran en la naturaleza, mezclas de los mismos (es decir, fusiones de secuencias de cadena kappa y lambda) y subsecuencias/fragmentos de los mismos. Las moléculas de anticuerpo que se encuentran en la naturaleza contienen dos cadenas ligeras kappa o dos lambda. La principal diferencia entre cadenas ligeras kappa y lambda está en las secuencias de la región constante.

Según la invención, se proporcionan anticuerpos que se unen específicamente a glucoproteína de SAM-6/R y que compiten parcialmente o completamente por la unión de SAM-6 a glucoproteína de SAM-6/R. En una realización, se proporciona un anticuerpo que inhibe la unión de SAM-6 a glucoproteína de SAM-6/R. En diversos aspectos, el anticuerpo inhibe de manera competitiva la unión por al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más de la unión de SAM-6 a la glucoproteína de SAM-6/R o cualquier valor o intervalo numérico dentro de o incluyendo dichos valores porcentuales. En otra realización, se proporciona un anticuerpo que evita o bloquea la unión de SAM-6 a glucoproteína de SAM-6/R.

Los anticuerpos de la invención que compiten por la unión del anticuerpo SAM-6 a glucoproteína de SAM-6/R pueden presentar la especificidad de la unión de anticuerpo SAM-6. Así, un anticuerpo de glucoproteína de SAM-6/R que compite con anticuerpo SAM-6 por la unión a glucoproteína de SAM-6/R se puede unir de manera específica a un epítipo que incluye un resto carbohidrato unido a glucoproteína de SAM-6/R o a un resto carbohidrato unido a glucoproteína de SAM-6/R a que se une anticuerpo SAM-6. Un anticuerpo de glucoproteína de SAM-6/R también puede poder competir con anticuerpo SAM-6 por la unión a LDL u oxLDL. De acuerdo con esto, se proporcionan anticuerpos que se unen específicamente a glucoproteína de SAM-6/R y que compiten parcialmente o completamente por la unión de anticuerpo SAM-6 a glucoproteína de SAM-6/R o LDL u oxLDL, incluyendo anticuerpos que se unen al mismo epítipo, una parte del mismo epítipo o un resto carbohidrato como anticuerpo SAM-6.

Los anticuerpos de glucoproteína de SAM-6/R que compiten por la unión del anticuerpo SAM-6 a glucoproteína de SAM-6/R del anticuerpo se pueden investigar e identificar usando ensayos de unión de competición convencionales. Los anticuerpos investigados se seleccionan basándose en la capacidad para competir por la unión del anticuerpo SAM-6 a glucoproteína de SAM-6/R o LDL u oxLDL. La capacidad de un anticuerpo para competir por la unión de

SAM-6 a glucoproteína de SAM-6/R o para inhibir, evitar o bloquear la unión de SAM-6 a glucoproteína de SAM-6/R o LDL u oxLDL, se puede determinar por diversos ensayos conocidos en la técnica, incluyendo inmunoanálisis ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés).

5 Los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos que tienen afinidad de unión de anticuerpo SAM-6. La afinidad de unión de dichos anticuerpos puede diferir de anticuerpo SAM-6 (es decir, presentan mayor o menor afinidad por glucoproteína de SAM-6/R, LDL u oxLDL) y por lo tanto, los anticuerpos pueden variar en su capacidad para competir por la unión a glucoproteína de SAM-6, LDL u oxLDL. Los anticuerpos de la invención incluyen así anticuerpos que presentan mayor o menor afinidad por glucoproteína de SAM-6/R, LDL u oxLDL que el anticuerpo SAM-6. Por ejemplo, el anticuerpo de glucoproteína de SAM-6/R de la invención puede presentar una afinidad mayor o menor que 2-5, 5-10, 10-100, 100-1.000 o 1.000-10.000 veces la afinidad o cualquier valor o intervalo numérico dentro de o incluyendo dichos valores, como el anticuerpo de referencia (por ej., anticuerpo SAM-6). Los anticuerpos de glucoproteína de SAM-6/R no limitantes específicos presentan una afinidad de unión para glucoproteína de SAM-6/R, LDL u oxLDL dentro de aproximadamente 1-5.000 veces de la afinidad de unión de SAM-6 para glucoproteína de SAM-6/R, LDL u oxLDL. Los anticuerpos no limitantes específicos, adicionales, presentan una afinidad de unión para glucoproteína de SAM-6/R, LDL u oxLDL está dentro de aproximadamente K_d 10^{-2} M a aproximadamente K_d 10^{-15} M o dentro de aproximadamente K_d 10^{-6} M a aproximadamente K_d 10^{-12} M, de SAM-6 para glucoproteína de SAM-6/R, LDL u oxLDL, o cualquier valor o intervalo numérico dentro de o incluyendo dichos valores. En más realizaciones particulares, una afinidad de unión para glucoproteína de SAM-6/R, LDL u oxLDL con una constante de disociación (KD) menor que 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M 5×10^{-4} M, 10^{-4} M 5×10^{-5} M, 10^{-5} M 5×10^{-6} M, 10^{-6} M 5×10^{-7} M, 10^{-7} M 5×10^{-8} M, 10^{-8} M 5×10^{-9} M, 10^{-9} M 5×10^{-10} M, 10^{-10} M 5×10^{-11} M, 10^{-11} M 5×10^{-12} M, 10^{-12} M 5×10^{-13} M, 10^{-13} M 5×10^{-14} M, 10^{-14} M 5×10^{-15} M y 10^{-15} M o cualquier valor o intervalo numérico dentro de o incluyendo dichos valores.

La afinidad de unión se puede determinar por índice de asociación (K_a) y disociación (K_d). La constante de afinidad de equilibrio, KD, es la proporción de K_a/K_d . Los índices de asociación (K_a) y disociación (Kd) se pueden medir usando resonancia de plasmón superficial (SPR) (Rich and Myszka, *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 54 (2.000); Englebienne, *Analyst.* 123: 1.599 (1.998)). La instrumentación y los métodos para detección y seguimiento en tiempo real de los índices de unión son conocidos y están comercialmente disponibles (BiaCore 2000, Biacore AB, Upsala, Suecia y Malmqvist, *Biochem. Soc. Trans.* 27: 335 (1.999)). Los valores KD se pueden definir como la concentración de anticuerpo requerida para saturar la mitad (50%) de los sitios de unión en glucoproteína de SAM-6/R.

30 Los métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la glucoproteína de SAM-6/R o un fragmento inmunogénico de la misma, opcionalmente conjugada a un portador tal como hemocianina extraída de la lapa californiana (KLH, por sus siglas en inglés) u ovalbúmina (por ej., BSA) o mezclada con un adyuvante tal como adyuvante completo o incompleto de Freund y usada para inmunizar a un animal. Usando tecnología de hibridoma convencional, los esplenocitos de animales inmunizados que responden a glucoproteína de SAM-6/R se pueden aislar y fusionar con células de mieloma. Para los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas se puede investigar la reactividad con glucoproteína de SAM-6/R o un fragmento inmunogénico de la misma.

Los animales que se pueden inmunizar incluyen ratones, ratas, conejos, cabras, ovejas, vacas o novillos, conejillos de Indias o primates. La inmunización inicial y cualquier inmunización posterior opcional puede ser por vías intravenosa, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea. Las inmunizaciones posteriores pueden ser a las mismas concentraciones o a concentraciones diferentes de preparación de glucoproteína de SAM-6/R y pueden ser a intervalos regulares o irregulares.

Los animales incluyen los modificados de manera genética para incluir los sitios génicos de IgG humana, que se pueden usar, por lo tanto, para producir anticuerpos humanos. Se describen animales transgénicos con uno o más genes de inmunoglobulina humana que no expresan inmunoglobulinas endógenas, por ejemplo en, la Patente de EE.UU. N° 5.939.598. Se describen métodos adicionales para producir anticuerpos policlonales humanos y anticuerpos monoclonales humanos (véase, por ej., Kuroiwa *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 20: 889 (2.002); las patentes internacionales WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; las Patentes de EE.UU. Nos. 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771 y 5.939.598). Una visión general de la tecnología para producir anticuerpos humanos se describe en Lonberg and Huszar (*Int. Rev. Immunol.* 13: 65 (1.995)).

Los anticuerpos de glucoproteína de SAM-6/R también se pueden generar usando otras técnicas incluyendo tecnologías del hibridoma, recombinante y de visualización de fagos o una combinación de las mismas (véanse las Patentes de EE.UU. Nos. 4.902.614, 4.543.439 y 4.411.993; véase, también Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, Kennett, McKearn and Bechtol (eds.), 1.980 y Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1.988).

Los anticuerpos de glucoproteína de SAM-6/R se pueden humanizar usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo, por ejemplo, injerto de CDR (patente europea EP 239.400; patente internacional WO 91/09967; Patentes de EE.UU. Nos. 5.225.539; 5.530.101 y 5.585.089), revestimiento o reconstrucción superficial (patente europea EP 592.106; EP 519.596; Padlan, *Molecular Immunol.* 28: 489 (1.991); Studnicka *et al.*, *Protein*

Engineering 7: 805 (1.994); Roguska. *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 91: 969 (1.994)) e intercambio de cadenas (Patente de EE.UU. N° 5.565.332). Las secuencias consenso humanas (Padlan, *Mol. Immunol.* 31: 169 (1.994) y Padlan, *Mol. Immunol.* 28: 489 (1.991)) se han usado previamente para producir anticuerpos humanizados (Carter *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89: 4.285 (1.992) y Presta *et al.*, *J. Immunol.* 151: 2.623 (1.993)).

- 5 Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica (por ej., Morrison, *Science* 229: 1.202 (1.985); Oi *et al.*, *BioTechniques* 4: 214 (1.986); Gillies *et al.*, *J. Immunol. Methods* 125: 191 (1.989) y las Patentes de EE.UU. Nos. 5.807.715; 4.816.567 y 4.816.397). Se describen anticuerpos quiméricos en que se sustituye un dominio variable de un anticuerpo de una especie por el dominio variable de otra especie, por ejemplo, en Munro, *Nature* 312: 597 (1.984); Neuberger *et al.*, *Nature* 312: 604 (1.984); Sharon *et al.*, *Nature* 309: 364 (1.984); Morrison *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 81: 6.851 (1.984); Boulianne *et al.*, *Nature* 312: 643 (1.984); Capon *et al.*, *Nature* 337: 525 (1.989) y Traunecker *et al.*, *Nature* 339: 68 (1.989).

10 Las técnicas adecuadas que se pueden emplear adicionalmente en métodos de anticuerpos incluyen purificación por afinidad basada en glucoproteína de SAM-6/R, purificación en gel no desnaturizante, HPLC o RP-HPLC, exclusión por tamaños, purificación en columna de proteína A o cualquier combinación de estas técnicas. El isotipo del anticuerpo se puede determinar usando un ensayo ELISA, por ejemplo, se puede identificar una Ig humana usando Ig anti-humana absorbida en Ig de ratón.

15 La glucoproteína de SAM-6/R adecuada para generar anticuerpos se puede producir por cualquiera de una variedad de técnicas de purificación de proteínas o de expresión recombinante, clásicas, conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede obtener glucoproteína de SAM-6/R de células, tales como células BXP3-3 (Depósito ATCC N° CRL-1687; Apartado de correos 1549 Manassas, VA, 20.108, USA) o células 23.132/87 (Depósito DSMZ N° ACC 201; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares), Inhoffenstrasse 7 B 38124 Braunschweig, Alemania).

20 Las formas de glucoproteína de SAM-6/R adecuadas para generar una respuesta inmunitaria incluyen subsecuencias de péptidos de glucoproteína de SAM-6/R de longitud completa, tal como un fragmento inmunogénico con al menos un resto carbohidrato unido a N u O o un fragmento inmunogénico que se une a anticuerpo SAM-6. Formas adicionales de glucoproteína de SAM-6/R incluyen preparaciones que contienen glucoproteína de SAM-6/R o extractos o fracciones celulares, glucoproteína de SAM-6/R parcialmente purificada así como células completas que expresan glucoproteína de SAM-6/R o preparaciones de dichas células que expresan glucoproteína de SAM-6/R.

25 Se describen además métodos para producir anticuerpos que se unen específicamente a glucoproteína SAM-6/R. En una realización, un método incluye administrar un polipéptido con un peso molecular en un intervalo de aproximadamente 80-82 kilodaltons (kDa), cuando se determina por electroforesis en gel desnaturizante, con al menos un resto carbohidrato unido a O y presenta al menos homología de secuencia parcial con Grp78 o un fragmento de la misma, a un animal, investigar en el animal la expresión de un anticuerpo que se une al polipéptido, seleccionar un animal que produzca un anticuerpo que se una al polipéptido y aislar el anticuerpo del animal seleccionado. En otra realización, un método incluye administrar un polipéptido con un peso molecular aparente en un intervalo de aproximadamente 80-82 kilodaltons (kDa), cuando se determina por electroforesis en gel desnaturizante, con al menos un resto carbohidrato unido a N u O y con al menos homología de secuencia parcial con Grp78 o un fragmento de la misma, a un animal, investigar en el animal la expresión de un anticuerpo que se una al polipéptido, seleccionar un animal que produzca un anticuerpo que se una al polipéptido y aislar el anticuerpo del animal seleccionado. En una realización más, un método incluye administrar un polipéptido con un peso molecular aparente en un intervalo de aproximadamente 80-82 kilodaltons (kDa), cuando se determina por electroforesis en gel desnaturizante, con al menos un resto carbohidrato unido a N u O y con al menos homología de secuencia parcial con Grp78 o un fragmento de la misma, a un animal capaz de expresar una inmunoglobulina humana; aislar células de bazo de un animal que produzca anticuerpo que se una al polipéptido o el fragmento de la misma, fusionar las células del bazo con una célula de mieloma para producir un hibridoma e investigar en el hibridoma la expresión de un anticuerpo que se una al polipéptido con un peso molecular aparente en un intervalo de aproximadamente 80-82 kilodaltons (kDa), cuando se determina por electroforesis en gel desnaturizante, con al menos un resto carbohidrato unido a N u O y con al menos homología de secuencia parcial con Grp78 o el fragmento de la misma. En diversos aspectos, el fragmento del polipéptido incluye una porción del polipéptido con un resto carbohidrato unido a N u O.

30 Se describe en la presente memoria producir anticuerpos distintos de anticuerpo SAM-6 que presenta una o más funciones o actividades de anticuerpo SAM-6. Las funciones o actividades ejemplares incluyen, por ejemplo, la unión a glucoproteína de SAM-6/R (por ej., dominio extracelular); unión a un epítipo que comprende un resto carbohidrato de glucoproteína de SAM-6/R o un fragmento inmunogénico de glucoproteína de SAM-6/R; competición por la unión de anticuerpo SAM-6 a glucoproteína de SAM-6/R; unión a LDL u oxLDL; competición por la unión de anticuerpo SAM-6 a LDL u oxLDL; teniendo afinidad de unión de anticuerpo SAM-6 (por ej., mayor o menor afinidad por glucoproteína de SAM-6/R), unión a una célula que expresa glucoproteína de SAM-6/R; unión a una célula que expresa glucoproteína de SAM-6/R y disminución o reducción de crecimiento o proliferación celular o estimulación o inducción de muerte, lisis o muerte celular programada de la célula (por ej., una célula neoplásica, tumoral o cancerígena, o de metástasis); unión a células BXP3-3 o 23132/87 e inhibición de crecimiento o proliferación celular

- de BXPC-3 o 23132/87 o estimulación o inducción de muerte celular, lisis o muerte celular programada de la célula BXPC-3 o 23132/87; producción de la activación de una caspasa (por ej., caspasa-3, caspasa-8 o caspasa-9). Funciones o actividades ejemplares también incluyen sensibilidad o insensibilidad de unión de glucoproteína de SAM-6/R a glucosidasas, por ejemplo, tratamiento con enzima O-glucosidasa de glucoproteína de SAM-6/R que reduce o que destruye la unión del anticuerpo a glucoproteína de SAM-6/R y tratamiento con enzima N-glucosidasa F de glucoproteína de SAM-6/R que no reduce o que no destruye la unión del anticuerpo a glucoproteína de SAM-6/R.
- Se describen en la presente memoria formas modificadas de proteínas, anticuerpos, ácidos nucleicos y otras composiciones, siempre que la forma modificada retenga, al menos una parte de, una función o actividad de la proteína, ácido nucleico o anticuerpo, no modificado o de referencia. Por ejemplo, se puede usar una glucoproteína de SAM-6/R modificada (por ej., una subsecuencia o fragmento) como un inmunógeno para producir anticuerpos que se unen específicamente a glucoproteína de SAM-6/R. Un anticuerpo de glucoproteína de SAM-6/R modificado (por ej., una subsecuencia o fragmento) se puede usar en los métodos de tratamiento, diagnóstico, detección sistemática y detección, de la invención.
- Como se usa en la presente memoria, el término "modifica" y variaciones gramaticales del mismo, significa que la composición se desvía de una composición de referencia. Dichas proteínas modificadas, ácidos nucleicos y otras composiciones pueden presentar mayor o menor actividad que, o una función distinta de una proteína no modificada, ácido nucleico o composición, de referencia.
- Las modificaciones incluyen sustituciones, adiciones y supresiones de aminoácido y resto carbohidrato de glucoproteína de SAM-6/R, que se pueden referir como "variantes." Ejemplos no limitantes específicos de modificaciones de aminoácidos incluyen subsecuencias y fragmentos de glucoproteína de SAM-6/R. Subsecuencias y fragmentos de glucoproteína de SAM-6/R ejemplares incluyen una porción de la glucoproteína de SAM-6/R que comprende un resto carbohidrato unido a N u O, el resto carbohidrato opcionalmente distinto de un resto carbohidrato de Grp78. Las subsecuencias y fragmentos de glucoproteína de SAM-6/R ejemplares también incluyen una porción inmunogénica de glucoproteína de SAM-6/R, por ejemplo, una porción de glucoproteína de SAM-6/R que incluye uno o más restos carbohidrato unidos a N u O. Las subsecuencias y fragmentos de glucoproteína de SAM-6/R ejemplares incluyen además una porción de glucoproteína de SAM-6/R que se une a anticuerpo SAM-6. Ejemplos no limitantes específicos de modificaciones del resto carbohidrato incluyen glucoproteína de SAM-6/R con uno o más restos azúcar suprimidos (un resto unido a O o un azúcar del mismo) que reduce o destruye la unión a anticuerpo SAM-6 o uno o más restos azúcar suprimidos (resto unido a N o un azúcar del mismo) que no reduce o destruye la unión a anticuerpo SAM-6.
- Como se usa en la presente memoria, el término "subsecuencia" o "fragmento" significa una porción de la molécula de longitud completa. Una subsecuencia de una glucoproteína de SAM-6/R presenta uno o más aminoácidos menos que una glucoproteína de SAM-6/R de longitud completa (por ej., una o más supresiones de aminoácidos internos o terminales de cualquier amino o carboxi-terminal). Una subsecuencia de un anticuerpo de glucoproteína de SAM-6/R presenta uno o más aminoácidos menos que un anticuerpo de glucoproteína de SAM-6/R de longitud completa. Una subsecuencia de ácidos nucleicos presenta al menos un nucleótido menos que una secuencia de ácidos nucleicos de comparación de longitud completa. Las subsecuencias, por lo tanto, pueden ser cualquier molécula natural de longitud hasta la longitud completa.
- Las subsecuencias y los fragmentos de anticuerpo de glucoproteína de SAM-6/R ejemplares de la invención incluyen Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs de una sola cadena (scFv), anticuerpos de una sola cadena, Fvs unido a disulfuro (sdFv) y fragmentos de los dominios V_L y V_H. Dichas subsecuencias y fragmentos pueden presentar la afinidad de unión como el anticuerpo de longitud completa, la especificidad de la unión como el anticuerpo de longitud completa o una o más actividades o funciones de como un anticuerpo de longitud completa, *por ej.*, una función o actividad de anticuerpo SAM-6. Los términos "subsecuencia funcional" y "fragmento funcional" cuando se refieren a un anticuerpo se refiere a una porción de un anticuerpo que retiene al menos una parte de una o más funciones o actividades como un anticuerpo de referencia intacto, *por ej.*, una función o actividad de anticuerpo SAM-6. Por ejemplo, una subsecuencia del anticuerpo que se une a glucoproteína SAM-6, un fragmento inmunogénico de glucoproteína SAM-6, LDL u oxLDL se considera una subsecuencia funcional.
- Las subsecuencias y fragmentos de anticuerpos se pueden combinar. Por ejemplo, una subsecuencia V_L o V_H se puede unir mediante una secuencia ligadora formando de ese modo una quimera V_L-V_H. Una combinación de subsecuencias Fvs de una sola cadena (scFv) se puede unir mediante una secuencia ligadora formando de ese modo una quimera scFv - scFv. Las subsecuencias y fragmentos de anticuerpos incluyen anticuerpos de una sola cadena o región o regiones variables solas o junto con todas o una porción de otras subsecuencias.
- Las subsecuencias de anticuerpos y fragmentos se pueden preparar por hidrólisis proteolítica del anticuerpo, por ejemplo, por digestión de pepsina o papaína de anticuerpos completos. Las subsecuencias y fragmentos de anticuerpos producidos por escisión enzimática con pepsina proporcionan un fragmento 5S indicado F(ab')₂. Este fragmento se puede escindir además usando un agente reductor de tiol para producir fragmentos monovalentes 3.5S Fab'. Alternativamente, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y el fragmento Fc directamente (véanse, *por ej.*, las Patentes de EE.UU. Nos. 4.036.945 y 4.331.647 y Edelman *et al.*,

Methods Enzymol. 1: 422 (1.967)). También se pueden usar otros métodos para escindir anticuerpos, tales como separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena ligera-pesada monovalentes, escisión adicional de fragmentos u otros enzimáticos o químicos.

5 Las proteínas y anticuerpos, así como subsecuencias y fragmentos de los mismos, se pueden producir por metodología genética. Dichas técnicas incluyen la expresión de todo o una parte del gen que codifica la proteína o anticuerpo en una célula hospedadora tal como células Cos o *E. coli*. Las células hospedadoras recombinantes sintetizan la longitud completa o una subsecuencia, por ejemplo, un scFv (véase, *por ej.*, Whitlow *et al.*, En: Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2: 97 (1.991), Bird *et al.*, *Science* 242: 423 (1.988) y la Patente de EE.UU. N° 4.946.778). Se puede producir Fvs de una sola cadena y anticuerpos como se describe en las Patentes de EE.UU. Nos. 4.946.778 y 5.258.498; Huston *et al.*, *Methods Enzymol.* 203: 46 (1.991); Shu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7.995 (1.993) y Skerra *et al.*, *Science* 240: 1.038 (1.988).

15 Las proteínas modificadas también incluyen uno o más D-aminoácidos sustituidos por L-aminoácidos (y mezclas de los mismos), análogos estructurales y funcionales, por ejemplo, peptidomiméticos con aminoácidos sintéticos o no naturales o análogos de aminoácidos y formas derivatizadas. Las modificaciones incluyen estructuras cíclicas tales como un enlace amida extremo a extremo entre el amino y carboxi-terminal de la molécula o enlace disulfuro intra- o inter-molecular.

20 Las proteínas modificadas incluyen además sustituciones de aminoácidos. En realizaciones particulares, una proteína modificada presenta una o algunas sustituciones conservadoras o no conservadoras. Dichas proteínas que incluyen sustituciones de aminoácidos se pueden codificar por un ácido nucleico. Por consiguiente, también se proporcionan proteínas que codifican secuencias de ácidos nucleicos que incluyen sustituciones de aminoácidos.

25 Una "sustitución conservadora" es la sustitución de un aminoácido por un resto biológicamente, químicamente o estructuralmente similar. Biológicamente similar significa que la sustitución no destruye una actividad biológica, *por ej.*, actividad de unión de SAM-6. Estructuralmente similar significa que los aminoácidos tienen cadenas laterales con similar longitud, tal como alanina, glicina y serina o un tamaño similar. Similitud química significa que los restos tienen la misma carga o son ambos hidrófilos o hidrófobos. Los ejemplos particulares incluyen la sustitución de un resto hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro o la sustitución de un resto polar por otro, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácidos glutámico por aspártico o glutamina por asparagina, serina por treonina y similares.

30 Las formas modificadas incluyen secuencias derivatizadas, por ejemplo, aminoácidos en que los grupos amino libres forman hidroclouros de amina, grupos p-toluenosulfonilo, grupos carbobenzoxi; los grupos carboxi libres de sales, ésteres metílicos y etílicos; grupos hidroxilo libres que forman O-acil- u O-alkil-derivados, así como derivados de aminoácidos que se encuentran en la naturaleza, por ejemplo, 4-hidroxi prolina, por prolina, 5-hidroxislisina por lisina, homoserina por serina, ornitina por lisina, etc. Las modificaciones se pueden producir usando métodos conocidos en la técnica (por ej., mutagénesis de supresión e inserción, dirigida al sitio basada en PCR, modificación química y mutagénesis, reticulación, etc.).

35 Las formas modificadas de proteína (por ej., anticuerpo), ácido nucleico y otras composiciones incluyen adiciones e inserciones. Por ejemplo, una adición puede ser la unión covalente o no covalente de cualquier tipo de molécula a una proteína (por ej., anticuerpo), ácido nucleico u otra composición. Típicamente las adiciones e inserciones confieren una función o actividad distinta.

40 Las adiciones e inserciones incluyen secuencias de polipéptidos o ácidos nucleicos de fusión (quiméricas), que es una secuencia que tiene una o más moléculas no presentes normalmente en una secuencia natural de referencia (tipo natural) unida mediante enlaces covalentes a la secuencia. Un ejemplo particular es una secuencia de aminoácidos de otra proteína (por ej., anticuerpo) para producir una proteína multifuncional (por ej., anticuerpo multiespecífico).

45 Según la invención, se proporcionan proteínas, anticuerpos, ácidos nucleicos y otras composiciones que incluyen un dominio heterólogo. Los dominios heterólogos pueden ser una adición o inserción de aminoácidos, pero no están restringidos a restos aminoácido. Así, un dominio heterólogo puede consistir en cualquiera de una variedad de diferentes tipos de restos funcionales pequeños o grandes. Dichos restos incluyen ácido nucleico, péptido, carbohidrato, lípido o pequeños compuestos orgánicos, tales como un fármaco (por ej., un agente proliferativo celular), metales (oro, plata), etc.

55 Los ejemplos no limitantes particulares de los dominios heterólogos incluyen, por ejemplo, placas, etiquetas detectables y agente citotóxicos. Ejemplos específicos de placas y etiquetas detectables incluyen enzimas (peroxidasa de rábano, ureasa, catalasa, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, cloramfenicol transferasa); sustratos enzimáticos; ligandos (por ej., biotina); receptores (avidina); radionúclidos (por ej., C¹⁴, S³⁵, P³², P³³, H³, I¹²⁵, I¹³¹, galio-67 y 68, escantio-47, indio-111, radio-223); placas T7-, His-, myc-, HA- y FLAG-; reactivos de densidad electrónica; moléculas de transferencia de energía; etiquetas paramagnéticas; fluoróforos (fluoresceína, rodamina, ficoertrina); cromóforos; agentes quimio-luminiscentes (imidazol, luciferasa) y bio-luminiscentes. Los ejemplos específicos de agentes citotóxicos incluyen dipteria, toxina, toxina del cólera y ricina.

Los ejemplos adicionales de dominios heterólogos incluyen, por ejemplo, agentes anti-proliferativos celulares (por ej., agentes anti-neoplásicos, anti-tumor o anti-cancerígenos o anti-metástasis). Los ejemplos no limitantes específicos de agentes anti-proliferativos celulares se describen en la presente memoria y son conocidos en la técnica.

- 5 Las secuencias ligadoras se pueden insertar entre la proteína (por ej., anticuerpo), ácido nucleico u otra composición y la adición o inserción (por ej., dominio heterólogo) a fin de que las dos entidades mantengan, al menos en parte, una función o actividad distinta. Las secuencias ligadoras pueden presentar una o más propiedades que incluyan una estructura flexible, una incapacidad para formar una estructura secundaria ordenada o un carácter hidrófobo o cargado que pueda activar o interactuar con cualquier dominio. Los aminoácidos encontrados típicamente en regiones de proteínas flexibles incluyen Gly, Asn y Ser. También se pueden usar otros aminoácidos casi neutros, tales como Thr y Ala, en la secuencia ligadora. La longitud de la secuencia ligadora puede variar (véase, *por ej.*, la Patente de EE.UU. N° 6.087.329). Los ligadores incluyen además agentes de reticulación química y conjugación, tales como sulfo-succinimidil-derivados (sulfo-SMCC, sulfo-SMPB), suberato de disuccinimidilo (DSS), glutarato de disuccinimidilo (DSG) y tartrato de disuccinimidilo (DST).
- 10
- 15 Más ejemplos de adiciones incluyen glucosilación, ácidos grasos, lípidos, acetilación, fosforilación, amidación, formilación, ubiquitinación y derivatización por grupos protectores/bloqueantes y cualquiera de numerosas modificaciones químicas. Otras permutaciones y posibilidades serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia y se considera que están dentro del alcance de la invención.

- Dichas secuencias modificadas se pueden hacer usando tecnología de ADN recombinante vía expresión celular o en traducción in vitro. Las secuencias de polipéptidos y ácidos nucleicos también se pueden producir por síntesis química usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, un aparato de síntesis peptídica automatizado (véase, *por ej.*, Applied Biosystems, Foster City, CA).
- 20

- Según la invención, se proporcionan glucoproteínas que codifican ácidos nucleicos aislados o purificados indicados como Receptor de SAM-6 (SAM-6/R) o glucoproteína de SAM-6/R, con un peso molecular aparente en un intervalo de aproximadamente 80-82 kilodaltons (KDa), cuando se determina por electroforesis en gel desnaturante. En una realización, una secuencia de ácidos nucleicos codifica una glucoproteína de SAM-6/R que tiene homología de secuencias de polipéptidos para Grp78 como se explica en la SEC ID N°: 1. En otra realización, una secuencia de ácidos nucleicos codifica una glucoproteína de SAM-6/R capaz de tener unidos a la misma al menos un resto carbohidrato unido a nitrógeno (N) u oxígeno (O) distinto de Grp78. En una realización más, una secuencia de ácidos nucleicos codifica una glucoproteína de SAM-6/R capaz de tener unidos a la misma al menos un resto carbohidrato unido a nitrógeno (N)- u oxígeno (O) que es un epítipo o es una parte de un epítipo a que el anticuerpo SAM-6 se une específicamente. Los ácidos nucleicos según la invención, por lo tanto, incluyen secuencias que codifican 1) glucoproteína de SAM-6/R que presenta identidad de la secuencia de polipéptidos para Grp78 como se explica en la SEC ID N°: 1; 2) secuencias de glucoproteína de SAM-6/R (por ej., capaz de tener unidos a la misma al menos un resto carbohidrato unido a nitrógeno (N)- u oxígeno (O)) que SAM-6 es capaz de unir específicamente y 3) subsecuencias y fragmentos de glucoproteína de SAM-6/R (por ej., SEC ID Nos: 2-12).
- 25
- 30
- 35

- Según la invención, se proporcionan también subsecuencias y fragmentos que codifican ácidos nucleicos, aislados o purificados, de glucoproteína de SAM-6/R. En una realización, una secuencia de ácidos nucleicos codifica una secuencia de glucoproteína de SAM-6/R capaz de tener unidos a la misma al menos un resto carbohidrato unido a nitrógeno (N)- u oxígeno (O)-, el resto carbohidrato opcionalmente distinto de un resto carbohidrato de Grp78. En aspectos particulares, la secuencia de ácidos nucleicos presenta una longitud de aproximadamente 10-20, 20-30, 30-50, 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-400, 400-500, 500-1.000, 1.000-2.000, nucleótidos o cualquier valor o intervalo numérico dentro de, o incluyendo dichas longitudes, y opcionalmente codifica una glucoproteína de SAM-6/R capaz de tener unidos a la misma al menos un resto carbohidrato unido a nitrógeno (N) u oxígeno (O) distinto de un resto carbohidrato de Grp78.
- 40
- 45

- Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" y similares se refieren a al menos dos o más pares de bases de ácidos ribo- o desoxi-ribonucleicos (nucleótidos) que se unen por un enlace fosfoéster o equivalente. Los ácidos nucleicos incluyen polinucleótidos y polinucleósidos. Los ácidos nucleicos incluyen moléculas sencillas, dobles o triples, circulares o lineales. Los ácidos nucleicos ejemplares incluyen pero no se limitan a: ARN, ADN, ADNc, ácido nucleico genómico, ácido nucleico que se encuentra en la naturaleza y que no se encuentra en la naturaleza, *por ej.*, ácido nucleico sintético.
- 50

- Los ácidos nucleicos pueden ser de diversas longitudes. Las longitudes de los ácidos nucleicos oscilan típicamente de aproximadamente 20 nucleótidos para 20 Kb o cualquier valor o intervalo numérico dentro de o incluyendo dichas longitudes, 10 nucleótidos para 10 Kb, 1 a 5 Kb o menos, 1.000 a aproximadamente 500 nucleótidos o menos en longitud. Los ácidos nucleicos también pueden ser más cortos, por ejemplo, 100 a aproximadamente 500 nucleótidos o de aproximadamente 12 a 25, 25 a 50, 50 a 100, 100 a 250 o aproximadamente 250 a 500 nucleótidos de longitud o cualquier valor o intervalo numérico o valor dentro de o incluyendo dichas longitudes. Los polinucleótidos más cortos se refieren comúnmente como "oligonucleótidos" o "sondas" de ADN monocatenario o bicatenario. Sin embargo, no hay límite superior para la longitud de dichos oligonucleótidos.
- 55

Los polinucleótidos incluyen formas L o D y mezclas de las mismas, que adicionalmente se pueden modificar para que sean resistentes a la degradación cuando se administren a un individuo. Los ejemplos particulares incluyen uniones 5' y 3' resistentes a endonucleasas y exonucleasas presentes en diversos tejidos o fluidos de un individuo.

5 En otra realización, la invención proporciona ácidos nucleicos que hibridan a un ácido nucleico que codifica todo o una subsecuencia o fragmento de secuencia de glucoproteína de SAM-6/R, que es al menos 75-90% complementaria u homóloga a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica todo o una subsecuencia o fragmento de secuencia de glucoproteína de SAM-6/R. En una realización, la secuencia de ácidos nucleicos presenta una longitud de aproximadamente 10-20, 20-30, 30-50, 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-400, 400-500, 500-1.000, 1.000-2.000, nucleótidos o cualquier valor o intervalo numérico dentro de, o incluyendo, dichas longitudes. En aspectos particulares, la secuencia de ácidos nucleicos hibrida a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica glucoproteína de SAM-6/R capaz de tener unidos a la misma al menos un resto carbohidrato unido a nitrógeno (N) u oxígeno (O) distinto de Grp78.

15 El término "hibridan" y variaciones gramaticales del mismo se refieren a la unión entre secuencias de ácidos nucleicos. Las secuencias de hibridación tendrán en general más de aproximadamente 50% de homología (por ej., 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más de identidad) a un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de una secuencia de referencia (por ej., glucoproteína de SAM-6/R) o una secuencia complementaria a un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de una secuencia de referencia (por ej., glucoproteína de SAM-6/R). Las secuencias de hibridación que son 100% o completamente complementarias a una secuencia de referencia, por ejemplo, a un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de una secuencia de referencia (por ej., glucoproteína de SAM-6/R), presentan 100% de apareamiento de bases sin errores de apareamiento. La región de hibridación entre secuencias de hibridación tiene típicamente al menos aproximadamente 12-15 nucleótidos, 15-20 nucleótidos, 20-30 nucleótidos, 30-50 nucleótidos, 50-100 nucleótidos, 100 a 200 nucleótidos o más o cualquier valor o intervalo numérico dentro de, o incluyendo, dichas longitudes.

25 Según la invención, se proporcionan además polinucleótidos antisentido, ARN de pequeña interferencia y ácido nucleico ribozima que hibridan específicamente a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica glucoproteína de SAM-6/R o una porción de la misma o una secuencia complementaria a un ácido nucleico que codifica glucoproteína de SAM-6/R o una porción de la misma. Los polinucleótidos antisentido pueden presentar una longitud de aproximadamente 10-20, 20-30, 30-50, 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-400, 400-500, 500-1.000, 1.000-2.000 nucleótidos o cualquier valor o intervalo numérico dentro de, o incluyendo, dichas longitudes. En una realización, una secuencia de ácidos nucleicos comprende un polinucleótido antisentido que se hibrida específicamente a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una glucoproteína de SAM-6/R capaz de tener unidos a la misma un resto carbohidrato unido a N u O distinto de un resto carbohidrato de Grp78. En aspectos particulares, un antisentido es al menos 90% complementario u homólogo a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica glucoproteína de SAM-6/R o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica glucoproteína de SAM-6/R capaz de tener unido a la misma al menos un resto carbohidrato unido a nitrógeno (N) u oxígeno (O) distinto de un resto carbohidrato de Grp78 o una secuencia complementaria a un ácido nucleico que codifica glucoproteína de SAM-6/R o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica glucoproteína de SAM-6/R capaz de tener unido a la misma al menos un resto carbohidrato unido a nitrógeno (N) u oxígeno (O) distinto de un resto carbohidrato de Grp78.

40 Como se usa en la presente memoria, el término "antisentido" se refiere a un polinucleótido o ácido nucleico peptídico capaz de unirse a una secuencia de ADN o ARN específica. Antisentido incluye polinucleótidos y ácidos nucleicos peptídicos (los PNA) de ARN y ADN mono, bi, tri-catenarios o más que se unen a ARN transcriptor o ADN. Los ejemplos particulares incluyen ARN y ADN antisentido que se une a ARN con sentido. Por ejemplo, un ácido nucleico monocatenario puede fijar como diana una proteína transcritora que participa en el metabolismo, catabolismo, eliminación o degradación de glucógeno de una célula (por ej., ARNm). Las moléculas antisentido son típicamente 95-100% complementarias a la cadena con sentido pero pueden ser "parcialmente" complementarias, en que sólo algunos de los nucleótidos se unen a la molécula con sentido (menor que 100% complementaria, *por ej.*, 95%, 90%, 80%, 70% y a veces menos) o cualquier valor o intervalo numérico dentro de, o incluyendo, dichos valores porcentuales.

50 El antisentido que forma triplex se puede unir a ADN bicatenario inhibiendo de ese modo la transcripción del gen. Los oligonucleótidos procedentes del sitio de iniciación de la transcripción de los genes, *por ej.*, entre las posiciones -10 y +10 del sitio de partida, son un ejemplo particular.

55 El ARN interferente corto (referido como ARNs o ARNi) para inhibir la expresión génica es conocido en la técnica (véase, *por ej.*, Kennerdell *et al.*, Cell 95: 1.017 (1.998); Fire *et al.*, Nature, 391: 806 (1.998); las patentes internacionales WO 02/44321; WO 01/68836; WO 00/44895, WO 99/32619, WO 01/75164, WO 01/92513, WO 01/29058, WO 01/89304, WO 02/16620 y WO 02/29858). El ARNi silenciador puede ser inducido por un ácido nucleico que codifique un ARN que forme una estructura de "horquilla" o por expresión de ARN de cada extremo de un ácido nucleico codificador, haciendo que se hibriden dos moléculas de ARN.

60 Las ribozimas, que son moléculas de ARN enzimático que catalizan la escisión específica de ARN se pueden usar para inhibir la expresión de la proteína codificada. Las ribozimas forman híbridos específicos de la secuencia con

ARN diana complementario, que se escinde después. Ejemplos específicos incluyen moléculas de ribozima de unidad de cabeza de martillo de ingeniería que pueden catalizar de manera específica y de manera eficaz la escisión endonucleolítica de secuencias que codifican una proteína que participa en el metabolismo, catabolismo, eliminación o degradación de glucógeno, por ejemplo.

- 5 Antisentido, ribozimas, ARNi y ácido nucleico formador de triplex se refieren de manera colectiva en la presente memoria como "ácido nucleico inhibidor" o "polinucleótidos inhibidores." Dicho ácido nucleico o polinucleótidos inhibidores pueden inhibir o evitar la expresión de glucoproteína de SAM-6/R.

Los polinucleótidos inhibidores no requieren elementos de control de la expresión para una función *in vivo*. Los polinucleótidos inhibidores puede ser absorbidos por la célula o entrar en la célula vía difusión pasiva. Los polinucleótidos inhibidores se pueden introducir opcionalmente en una célula usando un vector. Los polinucleótidos inhibidores se pueden codificar por un ácido nucleico a fin de que se transcriba. Además, un ácido nucleico que codifica un polinucleótido inhibidor se puede unir de manera operativa a un elemento de control de la expresión para expresión prolongada o aumentada del antisentido codificado en células o *in vivo*. El ácido nucleico inhibidor se puede diseñar basándose en la proteína y las secuencias de ácidos nucleicos descritas en la presente memoria o disponibles en la base de datos.

Las secuencias de ácidos nucleicos incluyen además sustituciones, adiciones y supresiones de nucleótidos y nucleósidos, así como formas derivatizadas y secuencias de fusión/quiméricas (por ej., que codifican polipéptido recombinante). Por ejemplo, debido a la degeneración del código genético, los ácidos nucleicos incluyen secuencias y subsecuencias degeneran con respecto a ácidos nucleicos que codifican glucoproteína de SAM-6/R y subsecuencias o fragmentos (por ej., un fragmento de glucoproteína de SAM-6/R capaz de tener unido al mismo al menos un resto carbohidrato unido a nitrógeno (N) u oxígeno (O) distinto de Grp78) o variantes del mismo. Otros ejemplos son ácidos nucleicos complementarios a una secuencia que codifica una secuencia de aminoácidos de una glucoproteína de SAM-6/R y subsecuencias o fragmentos de la misma.

Las supresiones de ácido nucleico (subsecuencias y fragmentos) pueden presentar de aproximadamente 10 a 25, 25 a 50 ó 50 a 100 nucleótidos. Dichos ácidos nucleicos son útiles para expresar subsecuencias de polipéptidos, para manipulación genética (como cebadores y moldes para multiplicación PCR) y como sondas para detectar la presencia o una cantidad de una secuencia que codifica una proteína (por ej., vía hibridación), en una célula, medio de cultivo, muestra biológica (por ej., tejido, órgano, sangre o suero) o en un individuo.

Se pueden producir ácidos nucleicos usando diversas técnicas de clonación y de síntesis química, clásicas. Las técnicas incluyen, pero no se limitan a multiplicación de ácidos nucleicos, *por ej.*, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con ADN genómico o dianas de ADNc usando cebadores (por ej., una mezcla de cebador degenerado) capaz de anillamiento a secuencia codificadora de anticuerpo. Los ácidos nucleicos también se pueden producir por síntesis química (por ej., síntesis de fosoramidita en fase sólida) o transcripción de un gen. Las secuencias producidas se pueden traducir después *in vitro* o clonar en un plásmido y propagarse y expresarse después en una célula (por ej., una célula hospedadora tal como levadura o bacterias, una eucariota tal como una célula de animal o de mamífero o en una planta).

Según la invención, se proporcionan además vectores que comprenden secuencias de ácidos nucleicos de la invención. En una realización, un vector incluye una secuencia de ácidos nucleicos que codifica glucoproteína de SAM-6/R. En otra realización, un vector incluye una secuencia de ácidos nucleicos que codifica subsecuencia o fragmento de glucoproteína de SAM-6/R capaz de tener unido a la misma al menos un resto carbohidrato unido a nitrógeno (N) u oxígeno (O), anticuerpo SAM-6 que es capaz de unirse de manera específica.

Los vectores incluyen vectores víricos, procariotas (bacterianos) y eucariotas (planta, fúngico, de mamífero). Los vectores se pueden usar para expresión de ácidos nucleicos *in vitro* o *in vivo*. Dichos vectores, referidos como "vectores de expresión," son útiles para introducir ácidos nucleicos, incluyendo ácidos nucleicos que codifiquen una glucoproteína de SAM-6/R, subsecuencias y fragmentos de los mismos, ácidos nucleicos que codifiquen ácido nucleico inhibidor y que expresen la proteína codificada o ácido nucleico inhibidor (por ej., en disolución o en fase sólida), en células o en un individuo *in vivo*.

Los vectores también se pueden usar para manipulación de ácidos nucleicos. Para manipulación genética se pueden emplear "vectores de clonación" y para transcribir o traducir el ácido nucleico insertado.

50 Un vector contiene en general un origen de replicación para propagación en una célula *in vitro* o *in vivo*. Los elementos de control, incluyendo los elementos de control de la expresión, presentes dentro de un vector, se pueden incluir para facilitar la transcripción y traducción, cuando sea apropiado.

Los vectores pueden incluir un marcador de selección. Un "marcador de selección" es un gen que permite la selección de células que contienen el gen. "Selección positiva" se refiere a un procedimiento en que las células que contienen el marcador de selección sobreviven en la exposición a la selección positiva. La resistencia a los fármacos es un ejemplo de un marcador de selección positivo - las células que contienen el marcador sobrevivirán en medio de cultivo que contenga el fármaco de selección y morirán las células que carezcan del marcador. Los marcadores de selección incluyen genes de resistencia a los fármacos tales como *neo*, que confiere resistencia a G418; *hygr*,

que confiere resistencia a higromicina y *puro*, que confiere resistencia a puromicina. Otros genes marcadores de selección positivos incluyen genes que permiten la identificación o detección sistemática de células que contienen el marcador. Estos genes incluyen genes para proteínas fluorescentes (GFP y cromóforos como GFP, luciferasa), el gen lacZ, el gen de fosfatasa alcalina y marcadores superficiales tales como CD8, entre otros. "Selección negativa" se refiere a un procedimiento en que las células que contienen un marcador de selección negativo se destruyen en la exposición a un agente de selección negativa apropiado. Por ejemplo, las células que contienen el gen del virus del herpes simple - timidina cinasa (*HSV-tk*) (Wigler *et al.*, Cell 11: 223 (1.977)) son sensibles al fármaco ganciclovir (GANC). De manera similar, el gen *gpt* hace sensibles las células a 6-tioxantina.

Los vectores víricos incluyen los basados en retrovírico (lentivirus para división de infección así como células que no se dividen), virus espumosos (Patentes de EE.UU. Nos. 5.624.820; 5.693.508; 5.665.577; 6.013.516 y 5.674.703; patentes internacionales WO 92/05266 y WO 92/14829), adenovirus (Patentes de EE.UU. Nos. 5.700.470; 5.731.172 y 5.928.944), virus adeno-asociado (AAV) (Patente de EE.UU. N° 5.604.090), vectores del virus de herpes simple (Patente de EE.UU. N° 5.501.979), vectores a base de citomegalovirus (CMV) (Patente de EE.UU. N° 5.561.063), reovirus, genomas del rotavirus, virus del simio 40 (SV40) o virus de papiloma (Cone *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6349 (1.984); Eukaryotic Viral Vectors. Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1.982; Sarver *et al.*, Mol. Cell. Biol. 1: 486 (1.981); Patente de EE.UU. N° 5.719.054). El adenovirus infecta de manera eficaz las células que se replican lentamente y/o diferenciadas de manera terminal y se pueden usar para fijar como diana las células que se replican lentamente y/o diferenciadas de manera terminal. Los vectores víricos adicionales útiles para la expresión incluyen parvovirus, virus Norwalk, coronavirus, paramyxo- y rhabdovirus, togavirus (por ej., virus sindbis y virus del bosque de semliki) y virus de la estomatitis vesicular (VSV).

Los vectores que incluyen un ácido nucleico se pueden expresar cuando el ácido nucleico se une de manera operable a un elemento de control de expresión. Como se usa en la presente memoria, el término "unido de manera operable" se refiere a una relación física o una funcional entre los elementos referidos que les permiten operar en su modo deseado. Así, un elemento de control expresión "unido de manera operable" a un ácido nucleico significa que el elemento de control modula la transcripción de ácidos nucleicos y cuando sea apropiado, la traducción de la transcripción.

El término "elemento de control de la expresión" se refiere a ácido nucleico que influye en la expresión de un ácido nucleico unido de manera operable. Los activadores y potenciadores son ejemplos no limitantes particulares de los elementos de control de expresión. Una "secuencia activadora" es una región reguladora de ADN capaz de iniciar la transcripción de una secuencia aguas abajo (dirección 3'). La secuencia activadora incluye nucleótidos que facilitan la iniciación de la transcripción. Los potenciadores también regulan la expresión génica, pero pueden actuar a una distancia del sitio de partida de la transcripción del gen a que se une de manera operable. Los potenciadores actúan en cualquier extremo 5' o 3' del gen, así como dentro del gen (por ej., en intrones o secuencias codificadoras). Los elementos de control de la expresión adicionales incluyen secuencias líder y secuencias de parejas de fusión, sitios de unión de ribosomas internos (IRES, por sus siglas en inglés) elementos para la creación de multigenes o policistrónico, mensajes, señal de proceso de corte y empalme para intrones, mantenimiento del marco de lectura correcto del gen para permitir la traducción dentro del marco de ARNm, señal de poliadenilación para proporcionar la poliadenilación apropiada de la transcripción de interés y codones de parada.

Los elementos de control de la expresión incluyen elementos "constitutivos" en que tiene lugar la transcripción de un ácido nucleico unido de manera operable sin la presencia de una señal o estímulo. Los elementos de control de la expresión que confieren expresión como respuesta a una señal o estímulo, que o aumentan o disminuyen la expresión de ácido nucleico unido de manera operable, son "regulables." Un elemento regulable que aumenta la expresión de ácido nucleico unido de manera operable como respuesta a una señal o estímulo se refiere como un "elemento inducible." Un elemento regulable que disminuye la expresión del ácido nucleico unido de manera operable como respuesta a una señal o estímulo se refiere como un "elemento reprimible" (*es decir*, la señal disminuye la expresión; cuando la señal se elimina o está ausente, la expresión aumenta).

Los elementos de control de la expresión incluyen elementos activos en un tejido o tipo de célula particular, referido como "elementos de control de la expresión específicos del tejido." Los elementos de control de la expresión específicos del tejido son típicamente más activos en tipos de célula o tejido específicos debido a que se reconocen por proteínas activadoras de la transcripción u otros reguladores activos de la transcripción en el tipo de célula o tejido específico, cuando se compara con otros tipos de célula o tejido.

Los elementos de control de la expresión específicos del tejido incluyen activadores y potenciadores activos en células hiperproliferativas, tales como trastornos proliferativos celulares incluyendo neoplasias, tumores y tumores malignos y metástasis. Los ejemplos no limitantes particulares de dichos activadores son: hexocinasa II, COX-2, alfa-fetoproteína, antígeno carcinoembrionario, DE3/MUC1, antígeno específico de la próstata, C-erbB2/neu, transcriptasa inversa de la telomerasa y activador responsable de la hipoxia.

Para expresión de bacterias, los activadores constitutivos incluyen T7, así como activadores inducibles tales como pL de bacteriófago λ , plac, ptrp, ptac (activador híbrido ptrp-lac). En sistemas celulares de insectos, se pueden usar activadores constitutivos o inducibles (por ej., ecdysona). En levadura, los activadores constitutivos incluyen, por ejemplo, ADH o LEU2 y activadores inducibles tales como GAL (véase, *por ej.*, Ausubel *et al.*, En: Current Protocols

in Molecular Biology, Vol. 2, Cap. 13, ed., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, 1.988; Grant *et al.*, En: Methods in Enzymology, 153: 516-544 (1.987), eds. Wu & Grossman, 1.987, Acad. Press, N. Y.; Glover, DNA Cloning. Vol. II, Cap. 3, IRL Press, Wash., D. C., 1.986; Bitter, En: Methods in Enzymology, 152: 673-684 (1.987), eds. Berger & Kimmel, Acad. Press, N. Y. y, Strathern *et al.*, The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces eds. Cold Spring Harbor Press, Vols. I y II (1.982)).

Para expresión en mamíferos, se pueden usar activadores constitutivos de orígenes víricos u otros orígenes. Por ejemplo, se usan SV40 o repeticiones terminales largas víricas (las LTR, por sus siglas en inglés) y similares o activadores inducibles procedentes del genoma de células de mamífero (por ej., activador de metalotioneína IIA; activador de choque térmico, elementos de respuesta a esteroide/hormona tiroidea/ácido retinoico) o de virus de mamíferos (por ej., el activador tardío de adenovirus; virus de tumor mamario de ratón LTR).

Según la invención, se proporcionan células hospedadoras transformadas o transinfectadas con un ácido nucleico o vector de la invención. Las células hospedadoras incluyen pero no se limitan a células procariotas y eucariotas tales como bacterias, hongos (levadura), células de planta, insecto y animal (por ej., mamífero, incluyendo primate y ser humano). Por ejemplo, las bacterias transformadas con ácido nucleico de bacteriófago recombinante, vectores de expresión de ácido nucleico de plásmido o ácido nucleico de cósmido; levadura transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes; sistemas celulares de plantas infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV, por sus siglas en inglés) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinante (por ej., plásmido de Ti); sistemas celulares de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ej., baculovirus) y sistemas celulares de animales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ej., retrovirus, adenovirus, virus vaccinia) o sistemas celulares de animales transformados logrados para expresión estable.

Las células pueden ser un aislado celular primario, cultivo celular (por ej., estirpe celular transmitida, estabilizada o inmortalizada) o parte de una pluralidad de células o un tejido u órgano *ex vivo* o en un individuo (*in vivo*). En realizaciones particulares, una célula es una célula hiperproliferativa, una célula que comprende un trastorno hiperproliferativo celular, una célula inmortalizada, célula neoplásica, célula tumoral o célula cancerígena o célula metastásica.

El término "transformadas" o "transinfectadas" cuando se usa en referencia a una célula (por ej., una célula hospedadora) u organismo, significa un cambio genético en una célula después de incorporación de una molécula exógena, por ejemplo, una proteína o ácido nucleico (por ej., un transgen) a la célula. Así, una célula "transinfectada" o "transformada" es una célula en que, o una progenie de la misma en que, se ha introducido una molécula exógena por la mano del hombre, por ejemplo, por técnicas de ADN recombinantes.

El ácido nucleico o la proteína se pueden transinfectar o transformar de manera estable o de manera transitoria (expresados) en la célula y progenie de la misma. La célula o las células se pueden propagar y la proteína introducida se puede expresar o el ácido nucleico se puede transcribir. Una progenie de una célula transinfectada o transformada puede no ser idéntica a la célula precursora, puesto que puede haber mutaciones que tengan lugar durante la replicación.

Típicamente, la transinfección o transformación celular emplea un "vector," que se refiere a un plásmido, virus, tal como un vector vírico u otro vehículo conocido en la técnica que se puede manipular por inserción o incorporación de un ácido nucleico.

Una partícula o vesícula vírica se puede diseñar para que sea fijada como diana para tipos de células particulares (por ej., células hiperproliferantes) por inclusión de una proteína en la superficie que se une a un ligando o receptor celular diana. Alternativamente, se puede incluir un activador y/o potenciador específico del tipo de célula en el vector para expresar el ácido nucleico en células diana. Así, la propia partícula o vesícula vírica, vector vírico o una proteína en la superficie vírica se pueden hacer células diana para transinfección o transformación *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

La introducción de composiciones (por ej., proteína y ácido nucleico) en células diana (por ej., células hospedadoras) también se puede realizar por métodos conocidos en la técnica tales como choque osmótico (por ej., fosfato de calcio), electroporación, microinyección, fusión celular, etc. La introducción de ácido nucleico y polipéptido *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* también se puede llevar a cabo usando otras técnicas. Por ejemplo, una sustancia polimérica, tal como poliésteres, poliaminoácidos, hidrogel, polivinilpirrolidona, etileno-acetato de vinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, sulfato de protamina o copolímeros de lactida/glicolida, copolímeros de polilactida/glicolida o copolímeros de etileno y acetato de vinilo. Se puede atrapar un ácido nucleico en microcápsulas preparadas por técnicas de coacervación o por polimerización superficial, por ejemplo, por el uso de microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina o microcápsulas de poli(metacrolato de metilo), respectivamente o en un sistema coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos macromoleculares, nano-cápsulas, microesferas, perlas y sistemas a base de lípidos, incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mezcladas y liposomas.

Los liposomas para introducir diversas composiciones en las células son conocidos en la técnica e incluyen, por

ejemplo, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, lipofectina y DOTAP (por ej., las Patentes de EE.UU. Nos. 4.844.904, 5.000.959, 4.863.740 y 4.975.282 y GIBCO-BRL, Gaithersburg, Md). También se conocen lípidos catiónicos anfífilicos a base de piperazina para tratamiento con genes (véase, *por ej.*, la Patente de EE.UU. N° 5.861.397). Los sistemas lipídicos catiónicos también son conocidos (véase, *por ej.*, la Patente de EE.UU. N° 5.459.127). Las sustancias poliméricas, microcápsulas y sistemas de dispersión coloidal tales como liposomas se refieren de manera colectiva en la presente memoria como "vesículas." De acuerdo con esto, se incluyen medios de vector vírico y no vírico de suministro a células, tejido u órganos, *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*.

La invención incluye métodos *in vivo*. Por ejemplo, puede estar presente una célula tal como una célula hiperproliferativa o trastorno hiperproliferativo celular que expresa glucoproteína de SAM-6/R en un individuo, tal como un mamífero (por ej., un individuo humano). Las células que comprenden el trastorno proliferativo celular o hiperproliferativo celular se pueden tratar, por lo tanto, por administración, por ejemplo, de un anticuerpo o subsecuencia o fragmento del mismo, que se une específicamente a glucoproteína de SAM-6/R o un ácido nucleico inhibidor de glucoproteína de SAM-6/R. Las células que comprenden el trastorno proliferativo celular o hiperproliferativo celular también se pueden tratar por administración de, por ejemplo, una glucoproteína de SAM-6/R o una subsecuencia de la misma, que puede provocar una respuesta inmunitaria contra glucoproteína de SAM-6/R, actuando de ese modo como una vacuna. Además, se pueden tratar trastornos y enfermedades asociadas a o producidas por niveles de LDL u oxLDL no deseables o excesivos según la invención por administración de, por ejemplo, un anticuerpo o subsecuencia o fragmento del mismo que se une específicamente a glucoproteína de SAM-6/R, que reduce LDL u oxLDL.

Según la invención, se proporcionan métodos para tratar la proliferación celular o un trastorno proliferativo celular o hiperproliferativo celular en un individuo. En una realización, un método incluye administrar a un individuo un anticuerpo que se une específicamente a anticuerpo de glucoproteína de SAM-6/R en una cantidad eficaz para tratar la proliferación celular o un trastorno proliferativo celular o hiperproliferativo celular en el individuo. En otra realización, un método incluye administrar a un individuo una glucoproteína de SAM-6/R en una cantidad eficaz para tratar la proliferación celular o un trastorno proliferativo celular o hiperproliferativo celular en el individuo.

Como se usa en la presente memoria, los términos "trastorno proliferativo celular" y "trastorno hiperproliferativo celular" y variaciones gramaticales de los mismos, cuando se usan con referencia a una célula, tejido u órgano, se refieren a cualquier crecimiento, proliferación, diferenciación o supervivencia de células, tejido u órganos no deseable, excesivo o anormal. Una célula hiperproliferativa indica una célula cuyo crecimiento, proliferación o supervivencia es mayor que lo deseado, tal como una célula normal de referencia, *por ej.*, una célula que es del mismo tejido u órgano pero no es una célula hiperproliferativa o una célula que falla al diferenciarse normalmente. Los trastornos proliferativos e hiperproliferativos celulares incluyen enfermedades y trastornos fisiológicos, los dos trastornos hiperplásicos benignos caracterizados por números de células, crecimiento celular, proliferación celular, supervivencia celular o diferenciación, no deseable, excesiva o anormal, en un individuo. Los ejemplos específicos de dichos trastornos incluyen neoplasia, tumores y cáncer (tumores malignos), metastásicos y no metastásicos.

En diversas realizaciones, un método incluye administrar a un individuo un anticuerpo o subsecuencia del mismo que se une específicamente a glucoproteína de SAM-6/R en una cantidad eficaz para tratar el trastorno proliferativo celular o hiperproliferativo celular en el individuo. En aspectos particulares, el trastorno es una neoplasia, tumor o cáncer metastásico y no metastásico (tumor maligno). En aspectos adicionales, el trastorno afecta o está presente en parte al menos en mama, pulmón, tiroides, cabeza y cuello, nasofaringe, nariz o senos nasales, cerebro, columna vertebral, glándula suprarrenal, tiroides, linfa, gastrointestinal (boca, esófago, estómago, duodeno, íleon, yeyuno (intestino delgado), colon, recto), tracto genito-urinario (útero, ovario, cervix, vejiga, testículo, pene, próstata), riñón, páncreas, glándula suprarrenal, hígado, hueso, médula ósea, linfa, sangre, músculo, piel o el sistema hematopoyético.

Los términos "neoplasia" y "tumor" se usan de manera indistinta en la presente memoria y se refieren a una célula o población de células de cualquier origen, célula, tejido u órgano, cuyo crecimiento, proliferación o supervivencia es mayor que el crecimiento, proliferación o supervivencia de una célula contrapuesta normal. Un "cáncer" es una neoplasia o tumor maligno, que invade típicamente otras regiones, tejidos u órganos y presenta el potencial para metastatizarse a otros sitios vía transporte sanguíneo o linfático.

Las neoplasias, los tumores y los tumores malignos incluyen un sarcoma, carcinoma, adenocarcinoma, melanoma, mieloma, blastoma, glioma, linfoma o leucemia. Los tumores malignos ejemplares incluyen, por ejemplo, carcinoma, sarcoma, adenocarcinoma, melanoma, trastornos neurales (blastoma, glioma), mesotelioma y reticuloendotelial, neoplásico linfático o hematopoyético (por ej., mieloma, linfoma o leucemia). En aspectos particulares, una neoplasia, tumor o cáncer incluye un adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón, carcinoma gástrico difuso o intersticial, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma de próstata, carcinoma de esófago, carcinoma de mama, adenocarcinoma de páncreas, adenocarcinoma de ovario o adenocarcinoma uterino.

La neoplasia, los tumores y los tumores malignos incluyen tipos benignos, malignos, metastásicos y no metastásicos e incluyen cualquier fase (I, II, III, IV o V) o el grado (G1, G2, G3, etc.) de neoplasia, tumor o cáncer o una neoplasia, tumor, cáncer o metástasis que está progresando, empeorando, está estabilizado o en remisión.

Las neoplasias, los tumores y los tumores malignos pueden surgir de una multitud de tipos de tumores primarios, incluyendo pero no limitado a mama, pulmón, tiroides, cabeza y cuello, nasofaringe, nariz o senos nasales, cerebro, columna vertebral, glándula suprarrenal, tiroides, linfa, gastrointestinal (boca, esófago, estómago, duodeno, íleon, yeyuno (intestino delgado), colon, recto), tracto genito-urinario (útero, ovario, cérvix, vejiga, testículo, pene, próstata), riñón, páncreas, glándula suprarrenal, hígado, hueso, médula ósea, linfa, sangre, músculo, piel y el sistema hematopoyético y se pueden metastatizar a sitios secundarios.

Una "neoplasia, tumor o cáncer sólido" se refiere a neoplasia, tumor o cáncer (por ej., metástasis) que se agrega típicamente junto y forma una masa. Ejemplos específicos incluyen tumores viscerales tales como melanomas, tumores malignos de mama, pancreáticos, uterinos y de ovario, cáncer testicular, incluyendo seminomas, cáncer gástrico o de colon, hepatomas, carcinomas adrenal, renal y de vejiga, tumores malignos de pulmón, cabeza y cuello y tumores/tumores malignos de cerebro.

Carcinomas se refieren a tumores malignos de tejido epitelial o endocrino e incluyen carcinomas del sistema respiratorio, carcinomas del sistema gastrointestinal, carcinomas del sistema genitourinario, carcinomas testiculares, carcinoma de mamas, carcinomas prostáticos, carcinomas del sistema endocrino y melanomas. El término también incluye carcinosarcomas, *por ej.*, que incluyen tumores malignos constituidos por tejidos carcinomatoso y sarcomatoso. Adenocarcinoma incluye un carcinoma de un tejido glandular o en que el tumor forma una estructura de tipo glándula. Melanoma se refiere a tumores malignos de melanocitos y otras células procedentes de origen celular de pigmento que pueden surgir en la piel, el ojo (incluyendo retina) u otras regiones del cuerpo. Se pueden formar carcinomas adicionales del útero/cérvix, pulmón, cabeza /cuello, colon, páncreas, testículos, glándula suprarrenal, riñón, esófago, estómago, hígado y ovario.

Sarcomas se refiere a tumores malignos de origen celular mesenquimal. Sarcomas ejemplares incluyen por ejemplo, linfosarcoma, liposarcoma, osteosarcoma, condrosarcoma, leiomiomasarcoma, rhabdomiosarcoma y fibrosarcoma.

Las neoplasias neurales incluyen glioma, glioblastoma, meningioma, neuroblastoma, retinoblastoma, astrocitoma oligodendrocitoma.

Ejemplos no limitantes específicos de neoplasias, tumores y tumores malignos susceptibles de tratamiento incluyen neoplasias malignas y no malignas, tumores y tumores malignos y metástasis. En particular, melanomas, tejido gástrico, carcinoma escamoso de pulmón, célula de adenocarcinoma de pulmón y células cancerígenas nasales, de cualquier fase (por ej., fases IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB o IV) o el grado (por ej., grados G1, G2 o G3). Ejemplos no limitantes específicos de metástasis incluyen carcinoma escamoso de pulmón y metástasis de adenocarcinoma a ganglio linfático y cerebro; metástasis de cáncer de mama (ductal invasivo) a ganglio linfático; metástasis de adenocarcinoma de colon a hígado y ganglio linfático; se detectó glucoproteína de SAM-6/R en metástasis de adenocarcinoma de estómago (intestinal y difuso) a ganglio linfático; metástasis de adenocarcinoma de páncreas a ganglio linfático; metástasis de carcinoma escamoso de cabeza y cuello a ganglio linfático y metástasis de melanoma a recto, esófago, piel, glándula parótida, colon, glándula suprarrenal y epitelio nasal.

Una "neoplasia, tumor o cáncer líquido" se refiere a una neoplasia, tumor o cáncer del sistema reticuloendotelial o hematopoyético, tal como un linfoma, mieloma o leucemia o una neoplasia que es difusa por naturaleza. Los ejemplos particulares de leucemias incluyen mieloma linfoblástico, mieloblástico y múltiple, agudo y crónico. Típicamente, dichas enfermedades surgen de leucemias agudas deficientemente diferenciadas, *por ej.*, leucemia eritroblástica y leucemia megacarioblástica aguda. Los trastornos mieloides específicos incluyen, pero no se limitan a, (por sus siglas en inglés) leucemia promieloide aguda (APML), leucemia mielógena aguda (AML) y leucemia mielógena crónica (CML); tumores malignos linfoides incluyen, pero no se limitan a, leucemia linfoblástica aguda (ALL), que incluye ALL linaje B y ALL linaje T, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia prolinfocítica (PLL), leucemia de células vellosas (HLL) y macroglobulinemia de Waldenstrom (WM). Los linfomas malignos específicos incluyen, linfoma no Hodgkin y variantes, linfomas de células T periféricas, leucemia/linfoma de células T de adulto (ATL), linfoma de células T cutáneas (CTCL), leucemia linfocítica granular grande (LGF), enfermedad de Hodgkin y enfermedad de Reed-Sternberg.

Según la invención, se proporcionan métodos para reducir LDL u oxLDL, así como métodos para tratar trastornos y enfermedades asociados a o producidos por niveles de LDL u oxLDL no deseables o excesivos. En una realización, un método incluye administrar a un individuo un anticuerpo que se une específicamente a glucoproteína de SAM-6/R en una cantidad eficaz para tratar el trastorno o enfermedad asociada a o producida por niveles de LDL u oxLDL no deseables o excesivos (por ej., niveles en plasma) en el individuo.

Los trastornos y enfermedades ejemplares no limitantes asociados a niveles de LDL u oxLDL no deseables o excesivos incluyen: hiperlipidemia, hipercolesterolemia, arteriosclerosis, enfermedad cardiovascular, cardiopatía (CHD), apoplejía, glomerulonecrosis, tensión arterial alta y diabetes. Así, en realizaciones adicionales, un método incluye administrar a un individuo un anticuerpo que se une específicamente a glucoproteína de SAM-6/R en una cantidad eficaz para tratar: hiperlipidemia, hipercolesterolemia, arteriosclerosis, enfermedad cardiovascular, cardiopatía (CHD), apoplejía, glomerulonecrosis, tensión arterial alta o diabetes.

Como se usa en la presente memoria, los términos "tratar," "que trata," "tratamiento" y variaciones gramaticales de

5 los mismos significan someter un paciente individual a un protocolo, régimen, procedimiento o remedio, en que se desea obtener una respuesta fisiológica o resultado en ese paciente. Como cada paciente tratado puede no responder a un tratamiento particular protocolo, régimen, procedimiento o remedio, el tratamiento no requiere que se consiga la respuesta fisiológica o el resultado deseado en cada paciente y en todos los pacientes o población de pacientes. De acuerdo con esto, un paciente o población de pacientes determinada puede fallar en responder o responder inadecuadamente al tratamiento.

10 Los métodos de la invención se pueden poner en práctica por cualquier modo de administración o por cualquier ruta, administración sistémica, regional y local. Las rutas de administración ejemplares incluyen intravenosa, intraarterial, intradérmica, intramuscular, subcutánea, intra-pleural, transdérmica (tópica), transmucosal, intra-craneal, intra-espinal, intra-ocular, rectal, oral (alimentaria) y mucosal.

Los métodos de la invención incluyen, entre otras cosas, métodos que proporcionan una mejora detectable o medible en un trastorno de un individuo determinado, tal como aliviar o mejorar uno o más síntomas adversos (físicos) o consecuencias asociadas a la presencia de un trastorno proliferativo celular o hiperproliferativo celular, neoplasia, tumor o cáncer o metástasis, es decir, un beneficio terapéutico o un efecto beneficioso.

15 Un beneficio terapéutico o efecto beneficioso es cualquier mejora objetiva o subjetiva, transitoria, temporal o a largo plazo en el trastorno o patología o una reducción en el comienzo, gravedad, duración o frecuencia de un síntoma adverso asociado a o producido por proliferación celular o un trastorno hiperproliferativo celular tal como una neoplasia, tumor o cáncer o metástasis. Se consigue un criterio de valoración clínico satisfactorio de un método de tratamiento según la invención, por ejemplo, cuando hay una reducción incremental o una parcial en la gravedad, duración o frecuencia de una o más patologías asociadas, síntomas adversos o complicaciones o inhibición o inversión de una o más de las manifestaciones fisiológicas, bioquímicas o celulares o características de proliferación celular o un trastorno hiperproliferativo celular tal como una neoplasia, tumor o cáncer o metástasis. Un beneficio terapéutico o mejora, por lo tanto, es una cura, tal como destrucción de células proliferantes diana (por ej., neoplasia, tumor o cáncer o metástasis) o ablación de una o más, la mayoría o todas las patologías, síntomas adversos o complicaciones asociadas a o producidas por proliferación celular o el trastorno hiperproliferativo celular tal como una neoplasia, tumor o cáncer o metástasis. Sin embargo, un beneficio o mejora terapéutica no se requiere que sea una cura o destrucción completa de todas las células proliferantes diana (por ej., neoplasia, tumor o cáncer o metástasis) o ablación de todas las patologías, síntomas adversos o complicaciones asociadas a o producidas por proliferación celular o el trastorno hiperproliferativo celular tal como una neoplasia, tumor o cáncer o metástasis. Por ejemplo, destrucción parcial de un tumor o masa celular cancerígena o una estabilización del tumor o masa cancerígena, tamaño o números de células por inhibición de la progresión o empeoramiento del tumor o cáncer, puede reducir la mortalidad y prolongar la vida incluso si sólo durante unos días, semanas o meses, incluso aunque permanezca una porción o el volumen del tumor o masa cancerígena, tamaño o células.

35 Ejemplos no limitantes específicos de beneficio terapéutico incluyen una reducción en neoplasia, tumor o cáncer o volumen de metástasis (tamaño o masa celular) o números de células, inhibición o prevención de un aumento en el volumen de neoplasia, tumor o cáncer (por ej., estabilización), retardo o inhibición de progreso, empeoramiento o metástasis de neoplasia, tumor o cáncer, estimulación, inducción o aumento de lisis de células de neoplasia, tumor o cancerígenas o muerte celular programada o inhibición de proliferación, crecimiento o metástasis de neoplasia, tumor o cáncer. Un método de la invención puede no tener efecto inmediatamente. Por ejemplo, el tratamiento puede ir seguido por un aumento en los números de células o masa celular de neoplasia, tumor o cáncer, pero estabilización o reducción eventual en el tiempo en masa celular de tumores, tamaño o números de células en un individuo determinado pueden tener lugar con posterioridad después de lisis celular o muerte celular programada de la neoplasia, tumor o cáncer o metástasis. La reducción de los niveles de LDL u oxLDL puede llevar varios días, semanas o incluso meses después de tratamiento.

45 Los beneficios adicionales incluyen reducir LDL u oxLDL, reducir o invertir el estrechamiento de arterias o venas en un individuo. La mejora en perfiles lipídicos y aumento de los niveles de HDL son también ejemplos no limitantes de beneficios del tratamiento.

50 Los síntomas adversos adicionales y complicaciones asociadas a neoplasia, tumor, cáncer y metástasis que pueden ser inhibidos, reducidos, disminuidos, retrasados o evitados incluyen, por ejemplo, náuseas, falta de apetito, apatía, dolor y malestar. Así, una disminución o reducción parcial o completa en la gravedad, duración o frecuencia de un síntoma adverso o complicación asociada a o producida por un trastorno hiperproliferativo celular, una mejora en el bienestar de los individuos, tal como energía, apetito, bienestar psicológico, aumentados, son todos ejemplos no limitantes particulares de beneficio terapéutico. Un beneficio terapéutico o mejora también puede incluir por lo tanto una mejora subjetiva en la calidad de vida de un individuo tratado.

55 En diversas realizaciones, un método reduce o disminuye volumen de neoplasia, tumor o cáncer o metástasis, inhibe o evita un aumento en volumen de neoplasia, tumor o cáncer, inhibe o retrasa el progreso o empeoramiento de neoplasia, tumor o cáncer, estimula neoplasia, tumor o cáncer o lisis de células metastásicas o muerte celular programada o inhibe, reduce, disminuye o retrasa proliferación o metástasis de neoplasia, tumor o cáncer. En una realización adicional, un método prolonga o extiende la vida del individuo. En una realización más, un método mejora la calidad de vida del individuo.

60

5 El examen de una muestra de biopsia que contiene una neoplasia, tumor o cáncer o metástasis (por ej., muestra de
sangre o tejido), puede establecer volumen de células o números de células neoplásicas, tumorales o cancerígenas
y, por lo tanto, si tiene lugar una reducción o estabilización en masa o números de células neoplásicas, tumorales o
cancerígenas o inhibición de proliferación, crecimiento o supervivencia de células de neoplasia, tumor o cáncer
10 (muerte celular programada). Para una neoplasia, tumor o cáncer sólido, los métodos de diagnóstico por la imagen
invasivos y no invasivos pueden determinar el tamaño o volumen de neoplasia, tumor o cáncer. El examen de
sangre o suero, por ejemplo, para poblaciones, números y tipos de células (por ej., trastornos hiperproliferativos
celulares hematopoyéticos) puede establecer si ha tenido lugar una reducción o estabilización en masa o números
de células neoplásicas, tumorales o cancerígenas o inhibición de proliferación, crecimiento o supervivencia (muerte
15 celular programada) neoplásica, tumoral o cancerígena.

Se pueden combinar composiciones y métodos de la invención con cualquier otro tratamiento o terapia que
proporcione un efecto deseado. En particular, son aplicables los tratamientos y las terapias que se han caracterizado
como que tienen una actividad o función anti-proliferativa celular. Los tratamientos y las terapias ejemplares incluyen
15 agentes o fármacos anti-proliferativos celulares o potenciadores inmunitarios. En el caso de niveles de LDL u oxLDL,
los tratamientos y las terapias adicionales incluyen agentes y fármacos reductores de LDL u oxLDL, tales como
estatinas. Los tratamientos y las terapias se pueden realizar previamente a, sustancialmente de manera
contemporánea con cualquier otro método de la invención, por ejemplo, un trastorno hiperproliferativo celular anti-
proliferativo celular (por ej., una neoplasia, tumor o cáncer o metástasis) o tratamiento o terapia de reducción de
LDL.

20 La invención, por lo tanto, proporciona métodos de asociación en que se usan los métodos de la invención en una
asociación con cualquier régimen terapéutico, protocolo o composición de tratamiento, tal como un protocolo anti-
proliferativo celular o reductor de LDL, agente o fármaco explicado en la presente memoria o conocido en la técnica.
En una realización, un método incluye administrar anticuerpo de glucoproteína de SAM-6/R o un ácido nucleico
25 inhibidor y un tratamiento, agente o fármaco anti-proliferativo celular o de activación inmunitaria. El tratamiento,
agente o fármaco anti-proliferativo celular o de activación inmunitaria se puede administrar previamente a,
sustancialmente de manera contemporánea con o después de administración de anticuerpo de glucoproteína de
SAM-6/R o un ácido nucleico inhibidor. En otra realización, un método incluye administrar un tratamiento, agente o
fármaco de reducción de LDL u oxLDL.

30 Como se usa en la presente memoria, un tratamiento, terapia, actividad o efecto "anti-proliferativo celular," "anti-
neoplásico," "anti-tumor" o "anti-cáncer" significa cualquier terapia, régimen de tratamiento, agente, fármaco,
protocolo o procedimiento que sea útil en el tratamiento de patologías, síntomas adversos o complicaciones
asociadas a o producidas por proliferación celular anormal o no deseable (hiperproliferación celular), un trastorno
hiperproliferativo celular, neoplasia, tumor o cáncer o metástasis. Las terapias, régimen de tratamiento, agentes,
35 fármacos, protocolo o procedimientos particulares pueden inhibir, disminuir, retardar, reducir, retrasar o evitar la
proliferación celular, crecimiento celular, hiperproliferación celular, crecimiento, proliferación, supervivencia o
metástasis neoplásica, del tumor o cáncer (maligno). Dichos tratamientos, terapias, regímenes, protocolos, agentes
y fármacos, pueden actuar rompiendo, reduciendo, inhibiendo o retrasando la progresión del ciclo celular o
proliferación celular o crecimiento; aumentando, estimulando o potenciando la muerte celular programada, lisis o
40 muerte de las células; inhibiendo la síntesis o el metabolismo de ácido nucleicos o proteínas; reduciendo,
disminuyendo, inhibiendo o retardando la división celular o disminuyendo, reduciendo o inhibiendo la supervivencia
celular o la producción o utilización de un factor de supervivencia celular, factor de crecimiento o ruta de señalización
(extracelular o intracelular).

Ejemplos de tratamientos y terapias anti-proliferativas celulares incluyen: quimioterapia, inmunoterapia, radioterapia
(ionizante o química), terapia térmica local o regional (hipertermia) y resección quirúrgica.

45 Las clases no limitantes específicas de agentes y fármacos anti-proliferativos celulares incluyen: agentes alquilantes,
anti-metabolitos, extractos de plantas, alcaloides de plantas, nitrosoureas, hormonas (esteroides), análogos de
nucleósidos y nucleótidos. Ejemplos no limitantes específicos de toxinas microbianas incluyen: toxina del cólera
bacteriana, toxina pertussis, toxina del ántrax, toxina de la difteria y ricino de toxinas de plantas. Ejemplos
específicos de fármacos incluyen: ciclofosfamida, azatioprina, ciclosporina A, melfalán, clorambucil, mecloretamina,
50 busulfán, metotrexato, 6-mercaptopurina, tioguanina, 5-fluorouracilo, 5-fluorouridina, citosina arabinósido, AZT, 5-
azacitidina (5-AZC) y compuestos relacionados con 5-azacitidina, bleomicina, actinomicina D, mitramicina,
mitomicina C, carmustina, calicheamicina, lomustina, semustina, estreptoizotocina, tenipósido, etopósido,
hidroxiurea, cisplatino, carboplatino, levamisol, mitotano, procarbazona, dacarbazina, taxol, vinblastina, vincristina,
vindesina, doxorubicina, daunomicina y dibromomantol. Ejemplos no limitantes específicos de hormonas incluyen
55 prednisona, prednisolona, dietilestilbestrol, flutamida, leuprolide y antagonistas de la hormona liberadora de
gonatrofina.

La radioterapia incluye suministro interno o externo a un individuo. Por ejemplo, pueden administrar rayos alfa, beta,
gamma y X al individuo de manera externa sin la internalización del individuo o de otro modo poniendo en contacto
físicamente el radioisótopo. Ejemplos específicos de dosis de rayos X oscilan desde dosis diarias de 0,01 a 0,05
60 C/kg (50 a 200 roentgens) durante periodos de tiempo prolongados (3 a 5/semana), una sola dosis de 0,5 a 1,5 C/kg
(2.000 a 6.000) roentgens. Las dosis varían ampliamente y dependen de la duración de la exposición, la vida media

del isótopo, el tipo de radiación emitida, el tipo de célula y posición tratada y la fase progresiva de la enfermedad. Ejemplos no limitantes específicos de radionúclidos incluyen, por ejemplo, ⁴⁷Sc, ⁶⁷Cu, ⁷²Se, ⁸⁸Y, ⁹⁰Sr, ⁹⁰Y, ⁹⁷Ru, ⁹⁹Tc, ¹⁰⁵Rh, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁴⁹Tb, ¹⁵³Sm, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁹⁴Os, ²⁰³Pb, ²¹¹At, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ²¹²Pb, ²²³Ra, ²²⁵Ac, ²²⁷Ac y ²²⁸Th.

5 Los anticuerpos que se unen a células tumorales son un ejemplo particular de un tratamiento o terapia anti-proliferativa celular. Los anticuerpos anti-tumor incluyen, por ejemplo, anticuerpo M195 que se une a antígeno CD33 de células de leucemia (Patente de EE.UU. N° 6.599.505); anticuerpo DS6 monoclonal que se une a antígeno asociado a tumor CA6 de carcinoma de ovario (Patente de EE.UU. N° 6.596.503); anticuerpo monoclonal IBD12 humano que se une a antígeno H superficial de células epiteliales (Patente de EE.UU. N° 4.814.275) y anticuerpo BR96 que se une a epítipo de carbohidrato Le^x expresado por carcinomas de colon, mama, ovario y pulmón. Los anticuerpos anti-tumor adicionales que se pueden emplear incluyen, por ejemplo, Herceptin (anticuerpo anti-Her-2 neu), Rituxan®, Zevalin, Bevacizumab (Avastin), Bexxar, Campath®, Oncolym, 17-1A (Edrecolomab), 3F8 (anticuerpo anti-neuroblastoma), MDX-CTLA4, IMC-C225 (Cetuximab) y Mylotarg.

10 Como se usa en la presente memoria, el término "activación inmunitaria," cuando se usa con referencia a un tratamiento, terapia, agente o fármaco significa que el tratamiento, terapia, agente o fármaco proporciona un aumento, estimulación, inducción o promoción de una respuesta inmunitaria, humoral o mediada por células. Dichas terapias pueden aumentar la respuesta inmunitaria en general o aumentar la respuesta inmunitaria a una diana específica, *por ej.*, un trastorno proliferativo celular o hiperproliferativo celular tal como una neoplasia, tumor o cáncer o metástasis.

15 Ejemplos no limitantes específicos de los agentes activadores inmunitarios incluyen: anticuerpo, factores de crecimiento celular, factores de supervivencia celular, factores diferenciativos celulares, citocinas y quimiocinas. Los ejemplos adicionales de agentes y tratamientos de activación inmunitaria incluyen células inmunitarias tales como linfocitos, célula plasmáticas, macrófagos, célula dendríticas, células NK y células B que expresan anticuerpo contra el trastorno proliferativo celular o de otro modo es probable que incrementen una respuesta inmunitaria contra el trastorno proliferativo celular. Las citocinas que activan o estimulan inmunogenicidad incluyen: IL-2, IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-7, factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), IFN- γ , IL-12, TNF- α y TNF β , que también son ejemplos no limitantes de agentes de activación inmunitaria. Las quimiocinas incluyendo MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, SDF-1, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, eotaxina, eotaxina-2, I-309/TCA3, ATAC, HCC-1, HCC-2, HCC-3, PARC, TARC, LARC/MIP-3 α , CK β , CK β 6, CK β 7, CK β 8, CK β 9, CK β 11, CK β 12, C10, IL-8, ENA-78, GRO α , GRO β , GCP-2, PBP/CTAPIII β -TG/NAP-2, Mig, PBSF/SDF-1 y linfotactina son además ejemplos no limitantes de agentes de activación inmunitaria.

20 Los métodos de la invención también incluyen, entre otras cosas, métodos que dan como resultado una necesidad o uso reducido de otro protocolo de tratamiento o régimen terapéutico, procedimiento o remedio. Por ejemplo, para una neoplasia, tumor o cáncer o metástasis, un método de la invención presenta un beneficio terapéutico si en un individuo determinado da como resultado una dosis menos frecuente o reducida o eliminación de un tratamiento o terapia anti-proliferativa celular (por ej., anti-neoplásica, antitumor o anti-cáncer) o de activación inmunitaria, tal como un fármaco quimioterapéutico, radioterapia, inmunoterapia o cirugía para tratamiento o terapia de neoplasia, tumor o cáncer o metástasis.

25 Según la invención, se proporcionan métodos para reducir la necesidad o el uso de un tratamiento o terapia anti-proliferativa celular (por ej., anti-neoplásica, anti-tumor, anti-cáncer o anti-metástasis). En una realización, un método incluye administrar a un individuo un anticuerpo que se une a glucoproteína de SAM-6/R en una cantidad eficaz para tratar un trastorno hiperproliferativo celular (por ej., una neoplasia, tumor o cáncer o metástasis) y para reducir o eliminar la necesidad de una terapia anti-proliferativa celular (anti-neoplasia, anti-tumor o anti-cáncer o anti-metástasis) o activadora inmunitaria. Los métodos se pueden realizar previamente a, sustancialmente de manera contemporánea con o después de administración de una terapia anti-neoplásica, tumoral, cáncer o metástasis o activadora inmunitaria.

30 La dosis o "cantidad eficaz " o "cantidad suficiente" en un método de tratamiento o terapia en que se desea conseguir un beneficio terapéutico o mejora incluye, por ejemplo, cualquier alivio o mejora objetiva o subjetiva de una, varias o todas las patologías, síntomas adversos o complicaciones asociadas a o producidas por la diana (por ej., trastorno hiperproliferativo celular), en una extensión medible o detectable, aunque prevenir, inhibir o retardar un progreso o empeoramiento de la patología diana (por ej., trastorno hiperproliferativo celular), síntoma adverso o complicación, es un resultado satisfactorio. Así, en el caso de un trastorno hiperproliferativo celular, la cantidad será suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico a un individuo determinado o para aliviar o mejorar una patología, síntoma adverso o complicación del trastorno en un individuo determinado. La dosis se puede aumentar o reducir de manera proporcional como indique el estado del tratamiento o diana terapéutica (por ej., trastorno hiperproliferativo celular) o cualquier o cualesquiera efectos secundarios del tratamiento o terapia.

35 Las cantidades no limitantes ejemplares (dosis) están en un intervalo de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg y cualquier valor o intervalo numérico o valor dentro de dichos intervalos. Se pueden administrar mayores o menores cantidades (dosis), por ejemplo, 0,01-500 mg/kg y cualquier valor o intervalo numérico o valor dentro de dichos intervalos. Las cantidades no limitantes ejemplares adicionales (dosis) oscilan de aproximadamente 0,5-50 mg/kg, 1,0-25 mg/kg, 1,0-10 mg/kg y cualquier valor o intervalo numérico o valor dentro de

dichos intervalos.

Los métodos de la invención se pueden poner en práctica una o más veces (por ej., 1-10, 1-5 ó 1-3 veces) al día, semana, mes o año. El experto sabrá cuando es apropiado retardar o interrumpir la administración. Un plan de dosificación no limitante ejemplar es 1-7 veces a la semana, para 1, 23, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más semanas y cualquier valor o intervalo numérico o valor dentro de dichos intervalos.

Por supuesto, como es típico para cualquier tratamiento o terapia, diferentes individuos presentarán diferentes respuestas al tratamiento y algunos pueden no responder o responden de manera inadecuada a un protocolo, régimen o procedimiento de tratamiento particular. Las cantidades eficaces y suficientes dependerán, por lo tanto, al menos en parte del trastorno tratado (por ej., proliferación celular, hiperplasia benigna o una neoplasia, tumor o cáncer y el tipo o fase, *por ej.*, el grado del tumor o cáncer y si está avanzado, en fase tardía o temprana), el efecto terapéutico deseado, así como el sujeto individual (por ej., la biodisponibilidad dentro del sujeto, género, edad, etc.) y la respuesta del individuo al tratamiento basado en variabilidad genética y epigenética (por ej., farmacogenómicos).

La toxicidad y viabilidad celular (célula muerte celular programada, lisis, proliferación de crecimiento, etc.) se pueden medir en una variedad de maneras sobre la base de ensayos colorimétricos, luminiscentes, radiométricos o fluorométricos conocidos en la técnica. Las técnicas colorimétricas para determinar la viabilidad celular incluyen, por ejemplo, exclusión del Azul de Trypán (véanse, por ejemplo, los Ejemplos 1 y 2). En pocas palabras, las células se tiñen con Azul de Trypán y se recuentan usando un hemocitómetro. Las células viables excluyen el colorante mientras las células muertas y agonizantes absorben el colorante azul y se distinguen fácilmente bajo un microscopio óptico. El Rojo Neutro es adsorbido por células viables y se concentra en lisosomas celulares; las células viables se pueden determinar con un microscopio óptico mediante números de cuantificación de células teñidas con Rojo Neutro.

Las técnicas fluorométricas para determinar la viabilidad celular incluyen, por ejemplo, yoduro de propidio, un agente de intercalación de ADN fluorescente. El yoduro de propidio se excluye de células viables pero tiñe el núcleo de células muertas. La citometría de flujo de células marcadas con yoduro de propidio se puede usar después para cuantificar células viables y muertas. La liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) indica daño estructural y muerte de células y se puede medir por un ensayo enzimático espectrofotométrico. La bromodeoxiuridina (BrdU) se incorpora a ADN recién sintetizado y se puede detectar con un anticuerpo marcado con fluorocromo. El colorante fluorescente Hoechst 33258 marca ADN y se puede usar para cuantificar la proliferación de células (por ej., citometría de flujo). La incorporación cuantitativa del colorante fluorescente succinimil éster diacetato de carboxifluoresceína (CFSE o CFDA-SE) puede proporcionar análisis de división celular (por ej., citometría de flujo). Esta técnica se puede usar *in vitro* o *in vivo*. La 7-aminoactinomicina D (7-AAD) es un intercalador fluorescente que experimenta un desplazamiento espectral en asociación con ADN y puede proporcionar análisis de división celular (por ej., citometría de flujo).

Las técnicas radiométricas para determinar proliferación celular incluyen, por ejemplo, [³H]-Timidina, que se incorpora a ADN recién sintetizado de células vivas y con frecuencia se usa para determinar proliferación de células. La liberación de cromo (⁵¹Cr) de células muertas se puede cuantificar por recuento de centelleo para cuantificar la viabilidad celular.

Las técnicas luminiscentes para determinar la viabilidad celular incluyen, por ejemplo, el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega Madison WI). Esta técnica cuantifica la cantidad de ATP presente para determinar el número de células viables.

Estuches comercialmente disponibles para determinar la viabilidad celular y la proliferación celular incluyen, por ejemplo, Cell Proliferation Biotrak ELISA (Amersham Biosciences Piscataway, NJ); el Ensayo Guava ViaCount™, que proporciona rápidos recuentos celulares y determinación de la viabilidad basándose en absorción diferencial de reactivos fluorescentes (Guava Technologies, Hayward, CA); el Estuche de Ensayo de Proliferación Celular CyQUANT® (Molecular Probes, Inc., Eugene OR) y el Estuche de Ensayo CytoLux (PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA). Los Estuches de Ensayo DELFIA® (PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA) pueden determinar la proliferación y la viabilidad celular usando un método fluorométrico resuelto en el tiempo. El Ensayo de Proliferación Celular Quantos™ es un ensayo basado en la fluorescencia que mide la fluorescencia de un complejo ADN-colorante de células lisadas (Stratagene, La Jolla, CA). El ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo es un ensayo luminiscente para medir la viabilidad celular (Promega, Madison WI).

Los términos "individuo" y "paciente" se usan de manera indistinta en la presente memoria y se refieren a animales, típicamente mamíferos, tal como seres humanos, primates no humanos (gorila, chimpancé, orangután, macaco, gibón), animales domésticos (perro y gato) animales de granja y de rancho (caballo, vaca, cabra, oveja, cerdo), animales de laboratorio y experimentales (ratón, rata, conejo, conejillo de Indias). Individuos incluye modelos animales de enfermedad (por ej., tales como ratones, ratas y primates no humanos) para estudiar eficacia *in vivo* (por ej., una neoplasia, tumor o cáncer o modelo animal de metástasis). Individuos humanos incluye niños, por ejemplo, recién nacidos, bebés, niños pequeños y adolescentes, entre las edades de 1 y 5,5 y 10 y 18 años, adultos entre las edades de 18 y 60 años y los ancianos, por ejemplo, entre las edades de 60 y 65, 65 y 70 y 70 y 100 años.

Individuos incluye mamíferos (por ej., seres humanos) con necesidad de tratamiento, esto es, presentan proliferación celular no deseable o anormal (hiperproliferación celular) o un trastorno hiperproliferativo celular. Individuos incluye los que presentan riesgo de tener un trastorno hiperproliferativo celular (por ej., presentan proliferación celular no deseable, esto es, están predispuestos a llegar a tener trastorno hiperproliferativo celular), un individuo candidato para, o un individuo con necesidad de, un tratamiento o terapia anti-proliferativa celular o de activación inmunitaria debido a un diagnóstico de laboratorio o clínico que garantice dicho tratamiento, individuos que experimentan una terapia anti-proliferativa celular o de activación inmunitaria e individuos que experimentan una terapia anti-proliferativa celular o de activación inmunitaria y se encuentran en riesgo de recaída o reaparición.

Individuos en riesgo incluyen aquéllos con una historia familiar, predisposición genética o que han padecido una afección previa con un trastorno proliferativo celular o hiperproliferativo celular (por ej., una hiperplasia benigna, neoplasia, tumor o cáncer o metástasis) y están en riesgo de recaída o reaparición. Individuos en riesgo incluyen además exposición medioambiental a carcinógenos o mutágenos, tales como fumadores o aquéllos en riesgo profesional (industrial, químico, agrícola). Dichos individuos con riesgo de desarrollar un trastorno proliferativo celular o hiperproliferativo celular tal como neoplasia, tumor o cáncer se pueden identificar con investigaciones genéticas para genes asociados a tumores, supresiones de genes o mutaciones de genes. Los individuos que carecen de *Brcal* están en riesgo de desarrollar cáncer de mama, por ejemplo. Los individuos con riesgo de desarrollar cáncer de colon presentan genes represores de tumores suprimidos o mutados, tal como poliposis adenomatosa coli (*APC*), por ejemplo. Se conocen individuos en riesgo que tienen predisposición genética particular a trastornos proliferativos celulares (véase, *por ej.*, The Genetic Basis of Human Cancer 2^a ed. por Bert Vogelstein (Autor), Kenneth W. Kinzler (Autor) (2.002) McGraw-Hill Professional; The Molecular Basis of Human Cancer. Editado por WB Coleman y GJ Tsongalis (2.001) Humana Press y The Molecular Basis of Cancer. Mendelsohn *et al.*, WB Saunders (1.995)).

Los individuos en riesgo se pueden tratar, por lo tanto, para inhibir o reducir la probabilidad de desarrollar un trastorno proliferativo celular o hiperproliferativo celular o después de haber sido curados de un trastorno proliferativo celular, haber padecido una recaída o reaparición del mismo o un trastorno proliferativo celular o hiperproliferativo celular diferente. El resultado de dicho tratamiento puede ser reducir el riesgo a desarrollar un trastorno proliferativo celular o hiperproliferativo celular o evitar un trastorno proliferativo celular o hiperproliferativo celular o una patología, síntoma adverso o complicación del mismo en el individuo con riesgo tratado.

En la presente memoria se describen estuches, incluyendo proteínas (por ej., anticuerpos), ácidos nucleicos, agentes, fármacos y formulaciones farmacéuticas, envasadas en material de embalaje adecuado opcionalmente junto con instrucciones para usar los componentes del estuche, *por ej.*, instrucciones para realizar un método de la invención. En una realización, un estuche incluye un anticuerpo que se une a glucoproteína de SAM-6/R e instrucciones para detectar glucoproteína SAM-6/R. En otra realización, un estuche incluye un anticuerpo que se une a glucoproteína de SAM-6/R o un ácido nucleico inhibidor e instrucciones para tratar una afección tratable con un anticuerpo o un ácido nucleico inhibidor que se une a glucoproteína de SAM-6/R o un ácido nucleico de glucoproteína de SAM-6/R. En un aspecto, las instrucciones son para tratar proliferación o hiperproliferación celular no deseable o un trastorno hiperproliferativo celular. En otro aspecto, las instrucciones son para tratar una neoplasia, tumor o cáncer o metástasis. En una realización más, un estuche incluye un anticuerpo que se une a glucoproteína SAM-6/R, instrucciones para tratar proliferación o hiperproliferación celular no deseable o un trastorno hiperproliferativo celular y un tratamiento, agente o fármaco anti-proliferativo celular o de activación inmunitaria. En diversos aspectos, un estuche incluye un agente antineoplásico, anti-cáncer o anti-tumor. En otros aspectos más, un estuche incluye un artículo de fabricación, por ejemplo, un artículo de fabricación para suministrar el anticuerpo o ácido nucleico, tratamiento, agente o fármaco anti-proliferativo celular o de activación inmunitaria a un individuo de manera local, de manera regional o de manera sistémica.

El término "material de embalaje" se refiere a una estructura física que envuelve los componentes del estuche. El material de embalaje puede mantener los componentes de manera estéril y se puede hacer de material comúnmente usado para dichos fines (por ej., papel, fibra corrugada, vidrio, plástico, hoja fina, ampollas, etc.). La etiqueta o inserto de embalaje puede incluir instrucciones escritas apropiadas, por ejemplo, poner en práctica un método de la invención, *por ej.*, tratar un trastorno proliferativo celular o hiperproliferativo celular, un ensayo para investigar, detectar o identificar glucoproteína de SAM-6/R o un ácido nucleico de glucoproteína SAM-6/R, etc. Así, en realizaciones adicionales, un estuche incluye una etiqueta o inserto de embalaje incluyendo instrucciones para poner en práctica un método de la invención en disolución, *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

Las instrucciones pueden incluir, por lo tanto, instrucciones para poner en práctica cualquiera de los métodos de la invención descritos en la presente memoria. Por ejemplo, se pueden incluir composiciones farmacéuticas de la invención en un envase, paquete o dispensador junto con instrucciones para administración a un individuo para tratar un trastorno proliferativo celular o hiperproliferativo celular, tal como una neoplasia, tumor o cáncer o metástasis. Las instrucciones pueden incluir adicionalmente indicaciones de un criterio de valoración clínico satisfactorio o cualquier síntoma adverso o complicación que pueda tener lugar, información de almacenaje, fecha de caducidad o cualquier información requerida por agencias reguladoras tales como la Administración de Medicamentos y Alimentos para uso en un individuo humano.

Las instrucciones pueden estar en "materia impresa," *por ej.* en papel o cartón dentro del estuche, en una etiqueta fijada al estuche o material de embalaje o unidas a un vial o tubo que contenga un componente del estuche. Las

instrucciones pueden comprender voz o cinta de video y adicionalmente se incluyen en un medio de lectura por ordenador, tal como un disco (disquete o disco duro), CD óptico tal como CD- o DVD-ROM/RAM, cinta magnética, medio de almacenaje eléctrico tal como RAM y ROM e híbridos de estos tales como medios de almacenaje magnético/óptico.

5 Los estuches de la invención pueden incluir adicionalmente un agente tampón, un conservante o un agente de estabilización de proteína/ácido nucleico. El estuche también puede incluir componentes de control para ensayar la actividad, *por ej.*, una muestra de control o un patrón. Cada componente del estuche puede estar incluido dentro de un envase individual o en una mezcla y todos los diversos envases pueden estar dentro de envases simples o múltiples.

10 La proteínas (por ej., glucoproteína SAM-6/R), ácidos nucleicos de anticuerpos (por ej., anticuerpo de glucoproteína SAM-6/R) y otras composiciones y métodos de la invención se pueden incluir en, o emplear, formulaciones farmacéuticas. Dichas formulaciones farmacéuticas son útiles para el tratamiento de o la administración o suministro a, un individuo *in vivo* o *ex vivo*.

15 Las formulaciones farmacéuticas incluyen portadores, diluyentes o excipientes "farmacéuticamente aceptables" y "fisiológicamente aceptables". Como se usa en la presente memoria, los términos "farmacéuticamente aceptable" y "fisiológicamente aceptable" incluyen disolventes (acuosos o no acuosos), disoluciones, emulsiones, medios de dispersión, recubrimientos, agentes de activación o retardo de la absorción, compatibles con administración farmacéutica. Dichas formulaciones pueden estar contenidas en un líquido; emulsión, suspensión, jarabe o elixir o forma sólida; tabla (recubierta o no recubierta), cápsula (dura o blanda), polvo, gránulo, cristal o microperla. También se pueden incorporar compuestos suplementarios (por ej., agentes conservantes, antibacterianos, antivíricos y antifúngicos) en las formulaciones.

20 Se pueden preparar formulaciones farmacéuticas para que sean compatibles con una vía de administración o suministro local, regional o sistémico. Así, las formulaciones farmacéuticas incluyen portadores, diluyentes o excipientes adecuados para administración por vías particulares. Ejemplos no limitantes específicos de rutas de administración para composiciones de la invención son: parenterales, *por ej.*, administración intravenosa, intraarterial, intradérmica, intramuscular, subcutánea, intra-pleural, transdérmica (tópica), transmucosal, intracraneal, intra-espinal, intra-ocular, rectal, oral (alimentaria), mucosal y cualquier otra formulación adecuada para el método de tratamiento o el protocolo de administración.

25 Las disoluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral pueden incluir: un diluyente estéril tal como agua para inyección, disolución salina, aceites fijados, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiamintetracético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tal como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio.

30 Las formulaciones farmacéuticas para inyección incluyen disoluciones acuosas estériles (en el caso de que sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Para administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen disolución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o disolución salina tamponada con fosfato (PBS). El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez se puede mantener, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. Los agentes antibacterianos y antifúngicos incluyen, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y timerosal. Los agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio se pueden incluir en la composición. Incluir un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina puede prolongar la absorción de las composiciones inyectables.

35 Se pueden preparar formulaciones inyectables estériles por incorporación de la composición activa en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con una o una asociación de los ingredientes anteriores. En general, se preparan dispersiones por incorporación de la composición activa en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y cualquier otro ingrediente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación incluyen, por ejemplo, secado a vacío y liofilización que proporcione un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una disolución preparada previamente del mismo.

40 Para administración transmucosal o transdérmica, se usan agentes penetrantes apropiados para que la barrera sea permeada en la formulación. Dichos agentes penetrantes son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal se puede llevar a cabo por el uso de aerosoles nasales, dispositivos de inhalación (por ej., aspiradores) o supositorios. Para administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles, cremas o parches.

Las formulaciones farmacéuticas se pueden preparar con portadores que protejan contra la rápida eliminación del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada o un material retardado en el tiempo tal como monoestearato de glicerilo o estearato de glicerilo. Las formulaciones también se pueden suministrar usando artículos de fabricación tales como implantes y sistemas de suministro microencapsulados para conseguir suministro local, regional o sistémico o liberación controlada o sostenida.

Se pueden usar polímeros biocompatibles, biodegradables, tales como etileno vinil acetato, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido láctico). Los métodos para preparar dichas formulaciones son conocidos para los expertos en la materia. Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation (Palo Alto, CA). Las suspensiones de liposomas (incluyendo liposomas fijados como diana a células o tejidos usando anticuerpos o proteínas de recubrimiento vírico) también se pueden usar como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar según métodos conocidos, por ejemplo, como se describe en la Patente de EE.UU. N° 4.522.811.

Formulaciones farmacéuticas adicionales, apropiadas para administración son conocidas en la técnica (véase, *por ej.*, Gennaro (ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20^a ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2.000); Ansel *et al.*, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7^a ed., Editores Lippincott Williams & Wilkins (1.999); Kibbe (ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 3^a ed. (2.000) y Remington's Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms. Technonic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa., (1.993)).

Las composiciones usadas según la invención, incluyendo proteínas (anticuerpos), ácido nucleico (inhibidor), tratamientos, terapias, agentes, fármacos y formulaciones farmacéuticas se pueden envasar en forma farmacéutica unitaria para facilidad de administración y uniformidad de la dosis. "Forma farmacéutica unitaria" como se usa en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas aptas como tratamiento con dosis unitarias; cada unidad contiene una cantidad de la composición en asociación con el portador, excipiente, diluyente o vehículo calculado para producir el tratamiento deseado o efecto terapéutico (por ej., beneficioso). Las formas farmacéuticas unitarias dependerán de una variedad de factores incluyendo, pero no limitándose necesariamente a, la composición particular empleada, el efecto que se tiene que conseguir y la farmacodinámica y la farmacogenómica del individuo que se tiene que tratar.

Se describen en la presente memoria métodos sin células (por ej., en disolución, en fase sólida) y a base de células (por ej., *in vitro* o *in vivo*) para detección sistémica, detección e identificación de glucoproteína SAM-6/R. Los métodos se pueden realizar en disolución, *in vitro* usando un material o muestra biológica e *in vivo*, por ejemplo, usando células neoplásicas, de tumor o cáncer o metastásicas, tejido u órgano (por ej., una biopsia) de un animal.

Se proporcionan métodos para identificar, detectar o detectar sistemáticamente glucoproteína de SAM-6/R y métodos para identificar, detectar o detectar sistemáticamente un ácido nucleico o porción del mismo codificando una secuencia de glucoproteínas de SAM-6/R. En una realización, un método incluye poner en contacto un material o muestra biológica con un anticuerpo que se une a glucoproteína de SAM-6/R en condiciones que permiten la unión del anticuerpo a glucoproteína de SAM-6/R y que ensaya la unión del anticuerpo a glucoproteína de SAM-6/R. La unión del anticuerpo glucoproteína de SAM-6/R detecta la presencia de glucoproteína de SAM-6/R. En otra realización, un método incluye poner en contacto un material o muestra biológica con un polinucleótido que se hibrida a un ácido nucleico o porción del mismo que codifica una secuencia de glucoproteína de SAM-6/R en condiciones que permiten la unión del polinucleótido al ácido nucleico y que ensaya la unión del anticuerpo a glucoproteína de SAM-6/R. La unión del polinucleótido al ácido nucleico detecta la presencia de glucoproteína de SAM-6/R. En un aspecto, la glucoproteína de SAM-6/R está presente en una célula o tejido. En otro aspecto, el material o muestra biológica se obtiene de un individuo mamífero. En un aspecto más, el anticuerpo que se une a glucoproteína de SAM-6/R es distinto de anticuerpo SAM-6.

Se describen además en la presente memoria métodos de diagnóstico sin células (por ej., en disolución, en fase sólida) y basados en células (por ej., *in vitro* o *in vivo*) a un individuo que tiene o tiene riesgo aumentado de que tenga proliferación celular no deseable o anormal o un trastorno hiperproliferativo celular (por ej., neoplasia, tumor o cáncer o metástasis). Los métodos se pueden realizar en disolución, *in vitro* usando un material o muestra biológica, por ejemplo, una biopsia de células sospechosas que puede comprender o ser indicativa de células, tejido u órgano neoplásico, de tumor o cáncer, o metástasis. Los métodos también se pueden realizar *in vivo*, por ejemplo, en un animal.

También se describen en la presente memoria métodos para diagnosticar a un individuo que tiene o tiene riesgo aumentado de que tenga proliferación celular no deseable o anormal o un trastorno hiperproliferativo celular (por ej., neoplasia, tumor o cáncer o metástasis). En una realización, un método incluye proporcionar un material o muestra biológica de un individuo, poner en contacto el material o muestra biológica con un anticuerpo que se une a glucoproteína de SAM-6/R en condiciones que permiten la unión del anticuerpo a glucoproteína de SAM-6/R y que ensaya la unión del anticuerpo a glucoproteína de SAM-6/R. La unión del anticuerpo a la glucoproteína de SAM-6/R diagnostica al individuo que tiene, o tiene riesgo aumentado de tener, proliferación celular no deseable o anormal o un trastorno hiperproliferativo celular (por ej., neoplasia, tumor o cáncer o metástasis). En un aspecto, el material o muestra biológica se obtiene de un ser humano. En otro aspecto, el material o muestra biológica comprende una

biopsia (por ej., una biopsia de pulmón, páncreas, estómago, mama, esófago, ovario o útero).

Se pueden poner en práctica ensayos de identificación, detección, detección sistemática y diagnóstico de la invención por análisis de células hiperproliferantes sospechosas, por ejemplo, una célula de un trastorno hiperproliferativo celular. Las células incluyen estirpes celulares hiperproliferantes, inmortalizadas, neoplásicas, de tumor y cáncer y aislados primarios procedentes de mama, pulmón, tiroides, cabeza y cuello, nasofaringe, nariz o senos nasales, cerebro, columna vertebral, glándula suprarrenal, tiroides, linfa, gastrointestinal (boca, esófago, estómago, duodeno, íleon, yeyuno (intestino delgado), colon, recto), tracto genito-urinario (útero, ovario, cérvix, vejiga, testículo, pene, próstata), riñón, páncreas, glándula suprarrenal, hígado, hueso, médula ósea, linfa, sangre, músculo, piel y el sistema hematopoyético y metástasis o sitios secundarios.

- 5 El término "poner en contacto," cuando se usa con referencia a una composición tal como una proteína (por ej., anticuerpo), material, muestra o tratamiento, significa una interacción directa o indirecta entre la composición (por ej., proteína tal como un anticuerpo) y las otras entidades referidas. Un ejemplo particular de interacción directa es la unión. Un ejemplo particular de una interacción indirecta es en el caso de que la composición actúe en una molécula intermediaria, que a su vez actúe en la entidad referida. Así, por ejemplo, poner en contacto una célula (por ej., que comprende un trastorno hiperproliferativo celular) con un anticuerpo incluye permitir que el anticuerpo se una a la célula (por ej., por unión a glucoproteína SAM-6/R) o permitir que el anticuerpo actúe en un intermedio que a su vez actúe en la célula.

- 10 Los términos "que ensaya" y "que mide" y variaciones gramaticales de los mismos se usan de manera indistinta en la presente memoria y se refieren a determinaciones cualitativas o cuantitativas o tanto determinaciones cualitativas como cuantitativas. Cuando los términos se usan con referencia a la unión, se considera cualquier medio para ensayar la cantidad relativa, afinidad o especificidad de la unión, incluyendo los diversos métodos explicados en la presente memoria y conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede ensayar o medir unión de anticuerpo por un ensayo ELISA.

- 15 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a que se refiere esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o prueba de la invención, se describen en la presente memoria métodos y materiales adecuados.

- 20 Como se usa en la presente memoria, las formas del singular "un", "y" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Así, por ejemplo, la referencia a "una glucoproteína " o "anticuerpo" incluye una pluralidad de glucoproteínas o anticuerpos y la referencia a "un tratamiento o terapia " puede incluir tratamientos o terapias múltiples o secuenciales, etc.

- 25 Como se usa en la presente memoria, todos los valores numéricos o intervalos numéricos incluyen números enteros al completo o incluyendo dichos intervalos y fracciones de los valores o los números enteros dentro de o incluyendo intervalos a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Así, por ejemplo, la referencia a un intervalo de 90-100%, incluye 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95%, 97%, etc., así como 91,1%, 91,2%, 91,3%, 91,4%, 91,5%, etc., 92,1%, 92,2%, 92,3%, 92,4%, 92,5%, etc., etcétera. Por ejemplo, la referencia a un intervalo de 1-5.000 veces incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10,11, 12,13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 veces, etc., así como 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5 veces etc., 2,1; 2,2; 2,3; 2,4; 2,5 veces etc., etcétera.

Lo siguiente es una tabla de estructuras de carbohidratos y abreviaturas para esas estructuras.

40

Tabla 1

Estructura del carbohidrato	Abreviatura
GalNAc β 1-4GlcNAc β -	Lac-di-Nac
GlcNAc β 1-3Gal β -	GlcNAc β 3Gal
GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3)Gal β 1-4GlcNAc β -	Tk
GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β -	GA1
GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -	A tipo 2
Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -	B tipo 2
Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β -	Gala1-3'Lac
GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α -	GlcNAc β 1-2'TF
Gal α 1-4GlcNAc β -	Gal α 4GlcNAc
Neu5Ac β -	ácido β -N-acetilneuramínico
Glc α 1-4Glc β -	maltosa
Glc α -	α -D-glucosa
Glc β -	β -D-glucosa
Gal α -	α -D-galactosa
Gal β -	β -D-galactosa
α -D-Man-	α -D-manosa
6-H ₂ PO ₃ Man α -	α -D-manosa-6-fosfato
α -L-Fuc-	α -L-fucosa
β -D-GlcNAc-	β -N-acetil-D-glucosamina
α -D-GalNAc-	α -N-acetil-D-galactosamina (Tn)
β -D-GalNAc-	β -N-acetil-D-galactosamina
Man α 1-3(Man α 1-6)Man α -	Man ₃
3-O-su-Gal β -	β -D-galactosa-3-sulfato
Neu5Ac α -	ácido α -N-acetilneuramínico
Neu5Ac α 2-3Gal α 1-4GlcNAc α -	3'SLN
Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β -	P _k , Gb ₃
Gal α 1-3GalNAc β -	T $\alpha\beta$
Gal β 1-3Gal β -	Gal β 3Gal
Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β -	Le ^a
Fuc α 1-2Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc β -	Le ^b
Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β -	Le ^d (H tipo 1)
Gal β 1-3GlcNAc β -	Le ^c
Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -	Le ^x
Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -	Le ^y
Gal β 1-4Glc β -	Lac
Gal β 1-4GlcNAc β -	LacNAc
Gal β 1-3GalNAc α -	TF
Fuc α 1-3GlcNAc β -	Fuca3GlcNAc
Fuc α 1-4GlcNAc β -	Fuca4GlcNAc, Le
GalNAc α 1-3GalNAc β -	Fs-2
GalNAc α 1-3GalNAc α -	núcleo 5
Gal α 1-3GalNAc α -	T $\alpha\alpha$
Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc β -	3'-SialLe ^e
Gal α 1-2Gal β -	Gal α 2Gal
Gal β 1-3GalNAc β -	T $\beta\beta$

(continuación)

GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-	(GlcNAc) ₂
Neu5Acα2-6GalNAcα-	sTn
Fucα1-2Galβ1-3GalNAcα-	H tipo 3
Neu5Acα2-3Galα1-4Glcα-	3'-SL
Neu5Acα2-3Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ-	sLe ^a
Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ-	sLe ^x
Neu5Acα2-6Galα1-4Glcα-	6'-SL
6-O-su-GlcNAcβ-	β-N-acetil-D-glucosamino-6-sulfato
O-su-3Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ-	3'-O-su-Le ^a
O-su-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ-	3'-O-su-Le ^x
3'-O-su-LacNAcβ-	3'-su-LacNAc
3'-O-su-Galβ1-3GlcNAcβ-	3'-su-Le ^c
Galα1-6Glcβ-	melibiosa
Galα1-3Galβ1-4GlcNAcβ-	Galα1-3'LacNAc
GlcNAcα1-3Galβ1-3GalNAcα-	GlcNAcα1-3'TF
Neu5Acα2-8Neu5Acα2	(Sia) ₂
Neu5Acα2-8Neu5Acα2-8Neu5Acα2	(Sia) ₃
GlcNAcβ1-3Galβ1-3GalNAcα-	GlcNAcβ1-3'TF
Galβ1-2Galβ-	Gal2βGal
Galβ1-4(6-O-su)GlcNAcβ-	6-O-su-LacNAc
Galβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNAcα-	núcleo 2
Fucα1-2Galβ1-3GalNAcβ-	H tipo 4
Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-	LNT
Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-	LNnT
Neu5Acα2-3Galβ-	GM4
Neu5Acα2-6Galβ-	Neu5Ac6Gal
GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ-	A _{tri}
Galα1-3(Fucα1-2)Galβ-	B _{tri}
GalNAcα1-3Galβ-	A _{di}
Galα1-3Galβ-	B _{di}
Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ-	H tipo 2
6'-su-LacNAcβ-	6'-O-su-LacNAc
Fucα1-2Galβ-	H _{di}
3'-O-su-Galβ1-3GalNAcα-	3'-O-su-TF
GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ	GlcNAcβ1-3'LacNAc
GalNAcβ1-3GalNAcβ-	di-GalNAcβ
Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcα-	3'-SiaTF
GlcNAcβ1-3GalNAcα-	núcleo 3
GlcNAcβ1-6GalNAcα-	núcleo 6
GlcNAcβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNAcα-	núcleo 4
Neu5Acα2-6(Neu5Acα2-3Galβ1-3)GalNAcα-	3,6-SiaTF
Galβ1-3(Neu5Acα2-6)GalNAcα-	6-SiaTF
Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6(Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-	YDS
Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6(Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-	9-OS
GlcNAcβ1-2Manα1-6(GlcNAcβ1-2Manα1-6)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-	7-OS
Neu5Acα2-3(Neu5Acα2-6)GalNAcα-	3,6-SiaTn

(continuación)

Neu5Aco2-3GalNAco	3-SiaTn
Neu5Aco2-6Galβ1-4GlcNAcβ-	6'SLN
Gal	Galactosa
Glc	Glucosa
Man	Manosa
Neu5Ac	Ácido N-acetilneuramínico
Fuc	Fucosa
Lac	Lactosa
GlcNAc	N-Acetilglucosamina
GalNAc	N-Acetilgalactosamina
LacNAc	N-Acetilactosamina

Se ha descrito una serie de realizaciones de la invención. Sin embargo, se entenderá que se pueden hacer diversas modificaciones sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. De acuerdo con esto, los siguientes ejemplos se destinan a ilustrar pero no a limitar el alcance de la invención descrito en las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1

Este ejemplo describe diversos materiales y métodos ejemplares.

Cultivo celular

- 10 Se cultivaron estirpe celular BXPC-3 de carcinoma de páncreas humano y estirpe celular 23132/87 de adenocarcinoma de estómago humano en RPMI 1640 (PAA, Viena, Austria) enriquecido con FCS inactivado por calor al 10% (PAA, Viena, Austria), L-glutamina 2 mM y penicilina/ estreptomycin (ambas 1%, PAA). Se cultivaron células de hibridoma productoras de anticuerpo SAM-6 en matraces para cultivo de células (175 cm²) en medio exento de suero AIM/V (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). Se incubaron todas las células en una atmósfera de CO₂ al 7%, humidificada, a 37°C.

Purificación de anticuerpo SAM-6

- 20 Para la purificación de anticuerpo SAM-6, se recogió sobrenadante de cultivo celular y se purificó vía columna de intercambio catiónico (columna HiTrap SP FF, Amersham Bioscience, Freiburg, Alemania) usando un sistema de cromatografía líquida rápida (FPLC, por sus siglas en inglés). Después de equilibración de la columna con tampón de partida (tampón de fosfato 20 mM pH 5,9) se aplicó sobrenadante de cultivo celular (mismo pH) a la columna. Se eluyeron las proteínas no ligadas con tampón de partida, mientras se desplazó anticuerpo ligado por concentración creciente de sal con tampón de elución al 75% (tampón de fosfato 20 mM, NaCl 1 M pH 8,0). Se diluyeron las fracciones que contenían anticuerpo en cloruro de sodio al 0,9%, se filtró estéril y se almacenó a -70°C hasta su uso. La pureza del anticuerpo se determinó por electroforesis en gel SDS y se confirmó la actividad por inmunohistoquímica y ensayos funcionales.

Preparación de extracto de membrana de célula tumoral (para purificación de antígeno).

- 30 Para la purificación de antígeno SAM-6 (glucoproteína de SAM-6/R), se aislaron proteínas de membrana de estirpe celular 23132/87 de adenocarcinoma de estómago humano usando el Estuche de Extracción de Proteínas de Membrana Naturales ProteoExtract™ (M-PEK) (Calbiochem, Darmstadt, Alemania). El procedimiento total de la extracción en 2 etapas, natural, de proteínas integrales y asociadas a membrana se realizó a 4°C o sobre hielo. Todas las disoluciones tampón y los reactivos requeridos fueron proporcionados en M-PEK. Se lavaron 3-5 x 10⁶ células tumorales (botón de células congeladas) dos veces con 2 ml de tampón de lavado enfriado en hielo. Después de 10 min de centrifugación a 300 x g y 4°C, se eliminó el sobrenadante sin alterar el botón y se desechó. Se volvió a suspender cuidadosamente el botón en 2 ml de tampón I de extracción enfriado en hielo que contenía 10 μl de cóctel inhibidor de proteasas. Después de 10 min de incubación a 4°C con agitación suave en un agitador rotatorio, se sedimentó el material insoluble por centrifugación a 16.000 x g y 4°C durante 15 min. Para el fin de control, se transfirió una alícuota del sobrenadante, enriquecido en proteínas solubles, a un tubo de muestra sin alterar la capa celular. Se desechó el resto de la fracción. En una segunda etapa de extracción, se añadió 1 ml de tampón II de extracción que contenía 5 μl de cóctel inhibidor de proteínas, al botón de la etapa I, se mezcló cuidadosamente usando una pipeta y se incubó durante 30 min a 4°C con agitación suave. Se centrifugó el material insoluble durante 15 min a 16.000 x g y 4°C. Se transfirió completamente el sobrenadante, ahora enriquecido en membranas integrales y proteínas asociadas a membrana, a un nuevo tubo de muestra sin alterar el botón de partículas. Se almacenaron las alícuotas a -20°C después de determinación del contenido en proteínas por el método BCA usando albúmina de suero bovino como patrón.

Análisis por método Western.

Se realizaron geles SDS-Page (8%) de reducción y ensayo por el método Western de proteínas de membrana usando protocolos clásicos. En resumen, se bloquearon membranas de nitrocelulosa de 0,2 μ m, secadas, con PBS que contenía Tween-20 al 0,05% (v/v) y leche desnatada en polvo al 5% (p/v), seguido por incubación durante 1 h con 20 μ g/ml de anticuerpo de IgM humana SAM-6 o IgM de control humana no relacionada (IgM Chrompure, Dianova, Hamburg, Alemania). El anticuerpo secundario (anticuerpo de anti-IgM humana de conejo acoplada a peroxidasa 1:1.000; Dianova) se detectó con el estuche quimioluminiscente SuperSignal de Pierce (Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, Alemania).

10 Purificación de receptor de SAM-6.

Se usó fracción de membrana obtenida de estirpe celular 23132/87 tumoral después de extracción con M-PEK para purificar el antígeno de anticuerpo SAM-6. Durante la primera de etapa de purificación se usó cromatografía de exclusión por tamaños. Se inyectaron 10 ml de extracto de M-PEK (1 mg/ml) a una columna Superdex 200 (XK16/60; Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) a un caudal de 1 ml/min usando un sistema de superbucle y una unidad de cromatografía líquida de proteína rápida (FPLC) (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Alemania). Se equilibró previamente la columna con tampón A (Tris/HCl 100 mM pH 7,5, NaCl 40 mM, AEDT 2 mM, Tritón X-100 al 1%) y se eluyó con el mismo tampón a un caudal de 2 ml/min. Se recogieron fracciones de 2 ml cada una y las fracciones correspondientes al pico de la actividad del receptor de SAM-6, se combinaron y se aplicaron a una columna de intercambio aniónico equilibrada (HiTrap™ Sepharose Q XL, 5 ml; Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). Se eluyeron los componentes no ligados con tampón A, mientras se liberó proteína ligada por concentración creciente de sal vía gradiente por etapas lineal usando tampón B (Tris/HCl 100 mM pH 7,5, NaCl 1 mM, AEDT 2 mM, Tritón X-100 al 1%).

De nuevo se usó un caudal de 2 ml/min y se recogieron fracciones de 2 ml y se vigiló a 280 nm. Después de concentrar el eluido mediante precipitación en acetona a -20°C durante la noche, se disolvió el botón de proteína en tampón 1x SDS y se examinó por análisis SDS-Page y por métodos Western para reacción con anticuerpo SAM-6. Se eliminaron las bandas positivas de gel teñido con Coomasie y se secuenció.

Identificación de proteínas por cartografía de masa peptídica.

Se realizó secuenciación de proteínas por TopLab (Martinsried, Alemania). Después de un SDS-Page unidimensional con tinción con Coomasie se eliminó una banda de proteína con una masa molecular estimada de 80 kDa y después de reducción y alquilación con yodoacetamida, la digirió in-gel la banda con tripsina. La mezcla de péptidos tripticos se desaló mediante ZipTipC18 y se analizó por ionización por Desorción Láser asistida por una Matriz (MALDI) Espectrometría de Masas (Voyager-DE STR; Applied Biosystems, CA, USA) seguido por investigación de base de datos (Profound and Mascot frente a NCBI). Se compararon los impactos para los mejores candidatos de proteínas de compatibilización (probabilidad de 1,00) usando la Herramienta de Investigación de Alineamiento Local Básica.

Estudios de transfección con ARN de pequeña interferencia de Grp78.

Se usó estirpe celular BXPC-3 para estudios de unión de receptor de SAM-6 después de transfección con ARN de pequeña interferencia (ARNsi). Se adquirió reactivo de mezcla SiGENOMA SMART contra HSPA5 humano, se diseñó y se validó ARNsi para silenciar la molécula diana Grp78, de Dharmacon (Lafayette, CO, USA). Se adquirió control Negativo Silencer™, como control para efectos no específicos sobre la expresión génica causados por la introducción de ARNsi de Ambion (Cambridge, RU).

Como otros controles sirvieron células transfectadas simuladas (sin ARNsi) y no tratadas (cultivadas en RPMI-1640 completo, no transfectadas). Para transfección de ARNsi se usó Lípido siLentFect™ (BioRad Laboratories, CA, USA). Adicionalmente, para controlar la transfección de ARNsi en las células, se transfectó ARNsi de Silenciador CY3 GAPDH (Ambion, Cambridge, RU) y se verificó usando microscopía confocal. El día antes de transfección se sembraron placas de 24 pozos con 1×10^4 células en 1 ml de medio de crecimiento completo por pozo (confluente al 50% al día siguiente). Se incubaron las placas durante la noche a 37°C y CO₂ al 7% 30 min previamente a transfección, se reemplazó cuidadosamente el medio por 0,4 ml de medio fresco y completo por pozo. Para cada pozo se prepararon 100 μ l de mezcla de transfección y se añadió a las células. La mezcla consistió en 49 μ l de OptiMEM sin suero (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), 1 μ l de Lípido siLentFect™ combinado con 50 μ l de ARNsi después de incubación durante 20 min a temperatura ambiente. La concentración final de mezcla SiGENOMA SMART fue 100 nM y 25 nM de los ARNsi de control. Se incubaron las células transfectadas durante un periodo de 24, 48 y 72 h a 37°C y atmósfera de CO₂ al 7%. La precipitación de Grp78 después del tiempo indicado se vigiló por análisis FACS.

55 Detección de precipitación de proteína Grp78 por análisis FACS.

Se transfectó estirpe celular BXPC-3 tumoral con ARNsi siGENOMA contra GRP78 humana. Se recogieron células

después de 1 y 3 días por desprendimiento suave con Tripsina/ AEDT (PAA, Viena, Austria). Después de 1 y 3 días, los niveles de proteína de GRP78 se vigilaron por análisis FACS. Respectivamente, se incubaron 2×10^5 células sobre hielo con anticuerpo SAM-6 (100 µg/ml), anticuerpo anti-GRP78 (100 µg/ml; clon ET-21, Sigma, Taufkirchen, Alemania) o anticuerpo anti-CD55 (1:50; clon 143-30, DPC Biermann, Bad Nauheim, Alemania) durante 30 minutos. La IgM humana no relacionada (IgM Chrompure, Dianova, Hamburg, Alemania) e IgG de conejo/ ratón (Sigma, Taufkirchen, Alemania) sirvieron como controles negativos. Siguió incubación con anticuerpos secundarios marcados con FITC (anticuerpo de anti-IgM humana de conejo, Dako, Hamburg, Alemania; anti-IgG de conejo de cabra o anti-IgG de ratón de cabra, ambos Acris, Hiddenhausen, Alemania) durante 15 minutos. Se analizaron las células por citometría de flujo (FACScan; Becton Dickinson, San Jose, California) usando el programa informático WinMDI.

Ensayo de muerte celular programada con SAM-6 en células tumorales transinfectadas.

La extensión de muerte celular programada inducida por anticuerpos en células BXPC-3 antes y después de transinfección con ARNsi GRP78 se detectó por la Detección de Muerte Celular ELISAPLUS (Roche, Mannheim, Alemania) según el protocolo del fabricante. 48 horas después de transinfección se pusieron en placas 1 x 10⁴ células en placas de 96 pozos y se incubaron en presencia de 100 µg/ml de anticuerpo SAM-6 o control de IgM no relacionada (IgM humana Chrompure, Dianova, Hamburg, Alemania) durante 4 h a 37°C y CO₂ al 7% en una atmósfera humidificada. Para demostrar el crecimiento normal, se enriquecieron las células con medio de crecimiento completo.

Preparación de extractos de membrana celular tumoral (para ensayo de glucosidasa).

Se cultivó estirpe celular BXPC-3 a confluencia del 80% en placas de cultivo de células de 100 mm. Se lavaron las placas de cultivo dos veces con disolución salina tamponada con fosfato pH 7,4 (PBS), se recogieron las células adheridas en PBS seguido por centrifugación durante 5 min a 157 rad/s (1.500 rpm). Se suspendieron las células en tampón hipotónico enfriado en hielo (HEPES 20 mM, KCl 3 mM, MgCl₂ 3 mM) y se incubaron durante 15 min, seguido por 5 min de vibración ultrasónica. Se granularon núcleos y citoesqueletos por 10 min de centrifugación a 10.000 x g. Se centrifugó el sobrenadante durante 30 min a 100.000 x g en un rotor SW28 para proporcionar el botón microsomal y finalmente se volvieron a suspender cuidadosamente en tampón de lisis modificado (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM; AEDT 1 mM; Nonidet NP-40 al 1% y desoxicolato de sodio al 0,25%). Se eliminó el material insoluble por centrifugación durante 10 min a 16.000 x g. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de muestra sin alterar el botón de partículas. Se almacenaron las alícuotas a -20°C después de determinación del contenido en proteínas por el método BCA usando albúmina de suero bovino como patrón. El procedimiento total se realizó a 4°C o sobre hielo. Se añadieron comprimidos de inhibidor de proteasas completo (Roche Biochemicals, Mannheim) a todas las disoluciones.

Ensayo de la glucosidasa

Se usaron extractos de membrana de células BXPC-3, preparados por centrifugación diferencial, para estudios de glucosilación. Para escindir todos los tipos de cadenas de carbohidrato unido a N y O, se desnaturizó el extracto de membrana en tampón que contenía dedecilsulfato de sodio al 1% y β-mercaptoetanol al 1% durante 3 min a 95°C. Se diluyó el extracto desnaturizado con tampón de reacción (PBS pH 7,4, nonidet NP-40 al 1%, β-mercaptoetanol al 1%) a la concentración final de proteína de 0,5 mg/ml. Para desglucosilación de carbohidratos unidos a O y N, se incubaron alícuotas de 100 µl o con 10 U de N-glucosidasa F (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) o 5 mU de O-glucosidasa (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) a 37°C durante la noche. El extracto no tratado en tampón de reacción sirvió como control. Se analizó la extensión de desglucosilación por procedimiento SDS-Page y método Western.

Ensayo de la glucosidasa en citospinas.

Se lavaron 4×10^5 células de carcinoma de páncreas humano (BXPC-3) y se volvieron a suspender en 1 ml de disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco pH 7,2 (Sigma, Taufkirchen, Alemania). Siguió incubación durante 4 horas a 37°C con 5 U/ml de N-glucosidasa o 20 mU/ml de O-glucosidasa (ambas Roche Applied Science, Mannheim, Alemania). Las células no tratadas en tampón de fosfato sirvieron como control. Se lavaron las correspondientes alícuotas de 100 µl y se centrifugaron en cubreobjetos a 52 rad/s (500 rpm) durante 2 min. Se fijaron las citospinas secas con acetona y se tiñeron de manera inmunohistoquímica.

Tinción inmunohistoquímica de citospinas.

Se fijaron las citospinas secas con acetona (10 minutos) y se bloquearon durante 30 min con leche desnatada en polvo/ PBS (4%). Después de lavar con Tris/NaCl, se incubaron los cubreobjetos con anticuerpo SAM-6 (50 µg/ml) o anticuerpos de control durante 30 minutos. Como control negativo sirvió IgM humana no relacionada (IgM Chrompure, Dianova, Hamburg, Alemania) en la misma concentración y como control positivo anticuerpo anti-CD55 (1:30; clon 143-30, DPC Biermann, Bad Nauheim, Alemania). Después de lavar con Tris/NaCl siguió incubación con anticuerpos secundarios durante 30 minutos (conjugado antihumano de conejo o antiratón de conejo marcado con peroxidasa 1:50). Después de lavado final con Tris/NaCl e incubación en PBS durante 10 minutos, se realizó tinción con diaminobenzidina (0,05 %)- peróxido de hidrógeno (0,02 %) durante 10 min a temperatura ambiente. La

reacción se detuvo bajo agua de grifo fluyendo y los cubreobjetos se contratiñeron con hematoxilina. Después de montaje con glicerol-gelatina, la extensión de desglucosilación se analizó de manera visual usando microscopía óptica.

Marcado de anticuerpo SAM-6 con isotiocianato de fluoresceína.

- 5 Se determinó endocitosis de anticuerpo SAM-6 en estirpe celular BXPC-3 de carcinoma de páncreas humano. Para estudios de inmunofluorescencia se realizó conjugación de anticuerpo SAM-6 monoclonal e IgM de control de isotipo (IgM Chrompure, Dianova, Hamburg, Alemania) con Estuche de Conjugación FITC de Marca de Flúor (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) según el protocolo del fabricante.

- 10 Se disolvieron anticuerpo SAM-6 purificado o control de isotipo de IgM en tampón carbonato - bicarbonato de sodio pH 9,0 a una concentración de 2,5 mg/ml. Por lo tanto, el tampón constituyente se intercambió con tampón de carbonato-bicarbonato de sodio pH 9,0 por una columna G-25 Sephadex™. La concentración final de anticuerpos fue aprox. 1,7 mg/ml (factor de dilución 1,5). Se preparó una disolución de isotiocianato de fluoresceína (FITC) en 2 ml de tampón carbonato-bicarbonato 0,1 M (por vial FITC) justo previamente a adición a anticuerpos. Se añadieron gota a gota 50 µl de la disolución FITC a 0,2 ml de cada disolución de anticuerpo y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente en la oscuridad con agitación suave. Finalmente, se usó una relación molar de 20:1 de FITC (MM 389) a IgM (MM 900) en la mezcla de reacción, conjugados fluoresceína-anticuerpo esperados con relación F/P de 3 a 6. Se tripsinizaron las células y se dejaron sobre hielo durante 1 h.

- 20 Se separaron los anticuerpos marcados con FITC de FITC libre por filtración en gel en una columna G-25 Sephadex™. Después de equilibración de la columna con al menos 30 ml de PBS se aplicó la mezcla de reacción a la parte superior del lecho de gel de la columna. La elución en columna empezó con 10 ml de PBS, recogándose fracciones de 0,25 ml. Durante la elución, el primero de dos picos que aparecen contenía el conjugado. El contenido en proteínas se determinó por el método BCA usando albúmina de suero bovino (Roth, Karlsruhe, Alemania) como patrón.

Endocitosis de SAM-6

- 25 Se determinó endocitosis para anticuerpo SAM-6 en la estirpe celular BXPC-3 de carcinoma de páncreas humano. Los anticuerpos monoclonales SAM-6 (purificados) y control de isotipo (IgM Chrompure, Dianova, Hamburg, Alemania), se conjugaron con Estuche de Conjugación FITC de Marca de Flúor (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) como se describió anteriormente. Se proporcionaron directamente anticuerpos conjugados a una concentración final de 40 µg/ml a 1×10^6 células y se incubaron durante 30, 60, 120 minutos a 37°C. Se recogieron las células, se enjuagaron y se volvieron a suspender en disolución salina tamponada con fosfato pH 7,4 (PBS). Se fijaron 100 µl de cada suspensión de células sobre portaobjetos. Finalmente los portaobjetos se montaron con Medio de Montaje Fluorescente (DakoCytomation, Carpinteria, USA) y se analizó por microscopía confocal.

Tinción de lípidos con Sudán III.

- 35 Para tinción de lípidos intracelular, se cultivaron células BXPC-3 de carcinoma de páncreas en portaobjetos de vidrio. Se incubaron las células adheridas durante 48 h con 100 µg/ml de anticuerpo SAM-6, anti-Grp78 (cloneET-21, Sigma, Taufkirchen, Alemania) o control no relacionado (IgM Chrompure, Dianova, Hamburg, Alemania). Después de dos etapas de lavado con PBS, se fijaron las células durante 5 minutos con isopropanol al 60%. Antes de uso, se maduró durante la noche una disolución al 60% de patrón de Sudán III (Sudán III al 0,5% en isopropanol al 100%), se filtró y se añadió a las células fijadas. Después de 40 minutos se lavaron las células con agua destilada, se diferenciaron en isopropanol al 60%, se lavaron de nuevo y se contratiñeron durante 6 minutos con hematoxilina. Finalmente, se enjuagaron las células con agua durante 10 minutos y se montaron con glicerol - gelatina. La extensión de inclusiones de lípidos se visualizó usando microscopía óptica.

Ensayo de citocromo C

- 45 Para investigar si se liberó citocromo c durante muerte celular programada inducida por SAM-6 se aplicó el Estuche ELISA de Citocromo C (Calbiochem, LaJolla, USA). En resumen, se incubaron $1,5 \times 10^6$ células de carcinoma de estómago (23132/87) con 200 µg/ml de SAM-6 purificado o anticuerpo de IgM no relacionado durante una y cuatro horas, respectivamente. Después de tripsinización, se lavaron las células tres veces con PBS frío, se volvieron a suspender en tampón de lisis y se incubaron durante una hora a TA con mezcla suave. Después de tres etapas de lavado con PBS enfriado en hielo y centrifugación a 1.000 x g durante 15 min, se transfirieron los sobrenadantes a un tubo fresco y se diluyeron (1:10) con Diluyente Calibrador RD5P (x1). Después se añadió una mezcla (1:1) de cada una de las muestras diluidas con Diluyente Calibrador RD5P (x1) a la placa de microtítulo suministrada en el estuche. Siguió una incubación durante dos horas a TA y después un lavado con tampón de lavado al 0,4 %. Después se puso el Conjugado de Citocromo C en cada pozo. Se repitieron las etapas de incubación y lavado de la manera anterior. Después de la adición de Disolución de Sustrato (mezcla 1:1 de Reactivo de Color A y B) a cada pozo, se incubó la placa durante 30 min a TA. La medición a 415 nm (longitud de onda de referencia 540 nm) se realizó después de la adición de Disolución de Parada.

Ensayo de la caspasa

Para detectar sistemáticamente en células tratadas con anticuerpo la actividad de Caspasa-2, -3, -6, -8 y -9 se usó el Estuche Muestreador de Ensayo de Proteasas Colorimétrico Apo Diana™ (Calbiochem, LaJolla, USA) siguiendo el manual de los suministradores. En resumen, se incubaron 3×10^6 células de carcinoma de estómago (23132/87) con 200 µg/ml de SAM-6 purificado o anticuerpo de IgM no relacionado durante una y cuatro horas, respectivamente. Después de tripsinización, se suspendieron de nuevo las células en tampón de lisis frío. Se incubaron durante 10 min sobre hielo y se centrifugó durante 1 min a $10.000 \times g$. Para determinar la cantidad de proteína en la célula se aplicó ensayo de Bradford de lisados. Cada extracto de citosol se diluyó a una concentración de proteína de 4 µg/ml. Después se añadió tampón de reacción que contenía DTT y los diversos sustratos de proteasa conjugados a las muestras en una placa de microtítulo de 96 pozos. Una mezcla (1:1) de lisis y tampón de reacción sirvieron como una muestra para ensayo en blanco. Después de incubación durante dos horas a 37°C y CO₂ al 7% en una incubadora de CO₂ humidificada, se midió la absorción y así la extensión de actividad de la caspasa en un lector de ELISA a 415 nm. Para experimentos con inhibidor de caspasa-3 se usó el Estuche de Ensayo de Actividad Celular de la Caspasa-3 (Calbiochem, LaJolla, USA) siguiendo el manual de los suministradores, usando condiciones similares como se describió anteriormente.

15 Estudios *in vivo*

Para determinar los efectos de anticuerpo SAM-6 en crecimiento de células tumorales *in vivo*, se usó un sistema de células de carcinoma de estómago de ratón/humano desnudo. En pocas palabras, se inyectaron 2×10^6 células de carcinoma de estómago (23132/87) de manera subcutánea (s. c.) a ratones NMRI-nu/nu de 6-7 semanas (Harlan Winkelmann GmbH, Borchon, Alemania) seguido por inyecciones de anticuerpo SAM-6 anticuerpo cuando los tumores alcanzaron un tamaño visible. Se proporcionaron 50, 250, 500 ó 750 µg de anticuerpo, respectivamente, los días 9, 11, 14, 16 y 17 i. p. post inyección de células de carcinoma. Se inyectaron ratones de control con 750 µg de IgM humana no relacionada (IgM Chrompure, Dianova, Hamburg, Alemania). Se midió de manera macroscópica el crecimiento tumoral visible durante el experimento. Se terminó el estudio cuando los tumores hubieron alcanzado un tamaño tolerable máximo (día 18), después de lo cual se sacrificaron los ratones, se determinó el volumen de tumor respectivamente peso de tumor y órganos y tejidos en que se inspeccionó la propagación de tumores y otras alteraciones.

Ejemplo 2

Este ejemplo incluye una descripción de purificación y análisis de glucoproteína SAM-6/R.

Análisis por métodos western en extractos de membrana.

30 El aislamiento y la caracterización de antígeno SAM-6 se realizó en la estirpe celular tumoral 23132/87 y BXPC-3. El anticuerpo SAM-6 se ligó a un antígeno con una masa molecular relativa de aproximadamente 80 kDa (Fig. 3). En las dos estirpes celulares, el método Western mostró resultados comparables en el patrón de bandas que aparecen. Tampoco hubo diferencia significativa, ya se usara centrifugación diferencial o el método MPEK para preparar las muestras. Sin embargo, para la purificación del antígeno se empleó el método de Estuche de Extracción de Membrana natural, debido al mayor enriquecimiento y menos bandas no específicas en el peso molecular inferior. Para descubrir la unión no específica de anticuerpos IgM, se usó IgM humana no relacionada para control. Se pudo observar unión no específica a aproximadamente 50 kDa. Las bandas de proteínas prominentes adicionales a una masa molecular de aproximadamente 60 y 100 kDa se desarrollaron como impurezas de fraccionamiento de membrana durante la preparación.

40 Purificación e identificación de receptor de SAM-6 humano por cartografía de masa peptídica.

Para identificar la unión de proteína de 80 kDa a anticuerpo SAM-6 en método de Western, se usaron dos etapas de cromatografía de columna para purificar y espectroscopía de masas MALDI para identificar la proteína. La Figura 4 muestra un cromatograma representativo después de la primera etapa (cromatografía de exclusión por tamaños). Las fracciones, que contenían la proteína que se une a anticuerpo SAM-6, se analizaron por SDS-PAGE, seguido por método Western y tinción de Coomassie. Las fracciones positivas se marcan en las Figuras 5 y 6. La segunda etapa siguió usando cromatografía de intercambio aniónico (cromatograma véase la Fig.7). El análisis posterior por SDS-PAGE se muestra en las Figuras 8 y 9. Las flechas indican la banda que representa la proteína de 80 kDa, que finalmente se eliminó y se secuenció. Se realizó secuenciación de proteínas por TopLab (Martinsried, Alemania). Una búsqueda en bases de datos de secuencias con el ajuste compatibilizado de masas peptídicas tríplicas calculó Grp78 humana (nº de acceso NP_005338.1) como el candidato de más alta clasificación. Se asignó un total de 21 masas peptídicas tríplicas a proteína Grp78 correspondiendo a una extensión de secuencias de aminoácidos de mínimo 35% (Figs. 10 y 11). El error de masa peptídica fue menor que 50 ppm.

Debido al alto número de péptidos asignados y la alta extensión de la secuencia, se identificó proteína Grp78 de la base de datos. La alineación de secuencias peptídicas derivadas de manera experimental y la secuencia de la base de datos de proteínas de Grp78 humana/ BiP se muestra en la Figura 11. El texto en negrita son secuencias que indican las masas obtenidas por identificación mediante huella dactilar de masa peptídica de MALDI y se marcan por estrellas en el mapa de masa peptídica (Fig. 10).

Análisis de la estructura

El análisis de la estructura para la potencial región trans-membrana y los sitios de glucosilación se realizó usando herramientas de análisis de secuencias del servidor de proteómica ExpPASy (Sistema de Análisis de Proteínas Experto, por sus siglas en inglés) del Instituto Suizo de Bioinformática (www.expasy.org). Además de las regiones de las señales en los amino-ácidos 1 a 17 y 650 a 654, Grp78 muestra una posible región transmembrana de amino-ácido 220 a 237 y potenciales sitios de O-glucosilación extra-celular en los restos de los aminoácidos 166 y 184. No se pudieron determinar los sitios de N-glucosilación (Fig. 11).

Ejemplo 3

Este ejemplo incluye una descripción de estudios de inhibición de la expresión de Grp78 con ARNsi.

10 Precipitación de Grp78

Se realizaron estudios para investigar si el silenciamiento de gen Grp78, junto con la precipitación de unión reducida de Grp78 de anticuerpo SAM-6 sobre células tumorales BXPc-3. La transfección de estirpe celular tumoral BXPc-3 con ARNsi de Grp78 redujo la expresión de proteínas y la unión de anticuerpo SAM-6. En células transfectadas con silencer™ Negativo, la fuerte unión de ARNsi (ARNsi no relacionado) de SAM-6 y los anticuerpos de control es detectable durante el tiempo de incubación total, que no muestra efectos significativos de expresión de Grp78. Las células transfectadas con ARNsi de GRP78 muestran unión reducida de anti-GRP78 (reducción del 76%) y SAM-6 (reducción del 70%). El silenciamiento no afectó a la expresión de otras moléculas de membrana de superficie celular. La unión de anti-CD55 después de transfección fue tan fuerte como antes (Figs. 12 y 13). La precipitación de GRP78 situada en la superficie reduce la expresión de proteínas diana y la unión de anticuerpo SAM-6 (Figs. 12 y 13).

Ensayo de muerte celular programada

Se midió la actividad apoptótica por Detección de Muerte Celular ELISA^{PLUS} (Roche) para demostrar la extensión de muerte celular programada inducida por anticuerpo de células tumorales transfectadas. Se incubaron las células transfectadas con 100 µg/ml de anticuerpo SAM-6 durante 4 h. La IgM humana no relacionada en la misma concentración fue control negativo. Las células tumorales transfectadas con ARNsi contra Grp78 humana mostraron una clara reducción de la actividad apoptótica inducida por anticuerpo SAM-6 comparado con las células no tratadas y las células transfectadas con ARNsi no relacionado (Fig. 14). El cálculo de contenido en células apoptóticas se relacionó con el contenido de células cultivadas en medio completo.

Ejemplo 4

30 Este ejemplo incluye una descripción de estudios sobre los efectos de tratamiento de glucosidasa de glucoproteína de SAM-6/R en unión de anticuerpo SAM-6.

Ensayo de la glucosidasa

Para confirmar la unión de anticuerpo SAM-6 en carbohidratos unidos a O, se estudió el efecto de la desglucosilación de extractos de membrana de estirpe celular tumoral BXPc-3. Se desglucosilaron extractos de membrana en condiciones reducidas con O- y N-glucosidasa durante la noche, después se separaron mediante SDS-Page y se analizaron por método Western. Después de incubación con glucosidasas el peso molecular de la proteína prominente de 80 kDa disminuye claramente y también lo hace la actividad de unión de SAM-6 (Fig. 15). Estos resultados indican que los azúcares están implicados en la unión de anticuerpo SAM-6 a glucoproteína SAM-6/R.

40 Ensayo de la glucosidasa en citospinas

Para confirmar la unión de anticuerpo SAM-6 sobre un resto carbohidrato unido a O en la superficie celular tumoral se realizó un Ensayo de Glucosidasa en citospinas. Se incubaron células de carcinoma de páncreas humano (BXPc-3) con N-glucosidasa u O-glucosidasa. Después de la preparación de las citospinas, se realizó una tinción con anticuerpo SAM-6 y anti-CD55.

45 La tinción inmunohistoquímica con anticuerpo SAM-6 muestra una reducción significativa de la unión superficial cuando se trata con O-Glucosidasa. El tratamiento con N-Glucosidasa no tuvo efecto detectable en la unión de anticuerpo SAM-6 (Fig. 16).

La molécula de la superficie celular CD55 sirvió como control para la integridad de membrana y no mostró unión cambiada después de tratamiento con glucosidasas.

50 Ejemplo 5

Este ejemplo incluye una descripción de los estudios de unión de anticuerpo SAM-6 a glucoproteína de SAM-6/R presente en las células.

Endocitosis de SAM-6

El anticuerpo SAM-6 se une a glucoproteína de SAM-6/R de membrana celular. Esta unión anticuerpo/receptor inicia la acumulación de lípidos y la cascada apoptótica. El anticuerpo SAM-6 también se une a oxLDL y lleva este a las células cancerígenas. Las lipoproteínas normalmente se internalizan mediante una endocitosis mediada por receptor. Para estudiar lo que ocurre después de que el anticuerpo SAM-6 se une a una membrana celular cancerígena, se conjugaron anticuerpo SAM-6 y un control de isotipo con FITC. Los anticuerpos conjugados en presencia de LDL se proporcionaron directamente a estirpe celular de carcinoma de páncreas humano BXPC-3 y se incubaron durante 30, 60, 120 minutos. Se analizaron las células finalmente por microscopía confocal. Después de 30 min de incubación con anticuerpo SAM-6, se pudo observar la unión a la superficie celular (Fig. 17A). Después de 60 min se concentró anticuerpo SAM-6 en la membrana, visto como una formación típica de "taponamiento" (Fig. 17B). Una hora más tarde se internalizó completamente el anticuerpo SAM-6 en la célula (Fig. 17C). En comparación, el anticuerpo de control etiquetado no mostró pruebas similares (Fig. 17D, E, F). Se puede asumir que se lleva oxLDL a la célula junto con el anticuerpo.

Tinción de lípidos con Sudán III

Para examinar la acumulación intracelular de lípidos inducida por anticuerpos SAM-6, se realizó una tinción con Sudán III. Este colorante es específico para la detección de lípidos neutros y ácidos grasos. La Fig. 18 muestra los datos obtenidos después de 48 h de incubación con anticuerpo SAM-6, anti-Grp78 o IgM de control humana no relacionada en la línea celular de carcinoma de páncreas BXPC-3. Cuando se trató con anticuerpo SAM-6, las células tumorales mostraron claramente una acumulación inducida por anticuerpo de gotitas de lípidos neutros (Fig. 18). Por el contrario, las células tratadas con anti-Grp78 y anticuerpo de control no relacionado no mostraron respectivamente acumulación significativa de lípidos. Estos datos indican que la acumulación intracelular de lípidos es un efecto directo mediado por anticuerpo SAM-6.

Muerte celular programada de SAM-6

La muerte celular programada inducida por SAM-6 puede ser una consecuencia de la homeostasis de lípidos alterada. Hasta ahora, sin embargo, no se conocía nada acerca de la ruta entre la unión del anticuerpo, acumulación de lípidos y la muerte celular última ni si se activan las caspasas. Un mejor entendimiento de la ruta de señalización activada por SAM-6 hará una contribución más a terapias innovadoras para la lucha contra el cáncer. Las caspasas se estudiaron, por lo tanto, por activación durante el procedimiento apoptótico inducido por SAM-6. Para examinar si se fijaba Citocromo C libre en células cancerígenas gástricas después de incubación con anticuerpo SAM-6 e IgM de control respectivamente, se aplicó el Estuche ELISA de Citocromo C. La técnica de inmunoensayo enzimático de sándwich indicó que se liberó Citocromo C en un mayor nivel en células tratadas con anticuerpo SAM-6 que en las células tratadas con la IgM humana, no relacionada, después de 1 h. Adicionalmente, la cantidad del polipéptido en ambas muestras difería más que después de cuatro horas de incubación. También es observable una disminución en la muestra de SAM-6 después de cuatro horas (Fig. 19). Esto indica claramente que en la ruta inducida por SAM-6 tuvo lugar una perturbación de la mitocondria conduciendo a la rotura de la membrana exterior y dando como resultado la liberación de Citocromo C. El nivel de Citocromo C en células tratadas con anticuerpo SAM-6 se aproximó al del control después de cuatro horas de incubación, que significa que la descomposición mitocondrial sólo tuvo lugar en una fase temprana de la ruta. Para determinar si las caspasas y qué caspasas son inducidas por anticuerpo SAM-6, se usó el Estuche Muestreador de Ensayo de Proteasas Colorimétrico Apo Target™. Después de 40 1 h de incubación con los anticuerpos se midió la actividad de la caspasa-2, -3, -6, -8 y -9. Las caspasas -8 y -9 pero no -2 iniciadoras se activaron en células tratadas con anticuerpo SAM-6 comparado con las tratadas con el control de la IgM humana no relacionada ya después de 1 h (Fig. 20A). Además, después de 4 h se pudo detectar una activación de las caspasas -3 y -6 efectoras.

Para excluir artefactos, se preparó adicionalmente un estudio usando un inhibidor de caspasa-3 como un ejemplo. La Figura 20B muestra la actividad de la caspasa-3 suprimida cuando se añadió el inhibidor. En ausencia del inhibidor de caspasa-3 se pudo observar una clara activación de caspasa-3 en las células tumorales tratadas con SAM-6.

Ejemplo 6

Este ejemplo incluye una descripción de estudios *in vitro* de melanoma maligno.

Para determinar el efecto de anticuerpo SAM-6 en células de melanoma, se determinó la sensibilidad de células de melanoma maligno HTB-69 y CRL 1424 para anticuerpo SAM-6. En pocas palabras, se tripsinizaron las células y se diluyó con RPMI que contenía FCS al 2% a una concentración de 2×10^5 células/ml. Se pusieron en placas 50 μ l de suspensión de células por pozo en una placa de 96 pozos. Se diluyó anticuerpo según 100 μ g/ml con RPMI (conduciendo a una concentración final de FCS al 1% por pozo). Se usaron IgM, RPMI y tampón como controles. Se incubaron las células en una incubadora a 37°C durante 2, 5, 24 ó 48 horas, se desechó el sobrenadante, se añadieron 30 μ l de Tripsina por pozo y se incubaron durante unos minutos y se reemplazaron las células del fondo del pozo observado con un microscopio. Se terminó la reacción con 6 μ l de FCS por pozo, se añadieron 324 μ l de Reactivo Guava ViaCount (Guava Technologies, Hayward, USA) por pozo y se mezcló suavemente y se incubó

durante 5 min. a temperatura ambiente y se analizaron los datos con Guava PCA-96.

Los datos indican que el anticuerpo SAM-6 podía destruir ambos tipos de células de melanoma. La destrucción de células fue mayor para células HTB-69 incubadas durante 48 horas.

Ejemplo 7

5 Este ejemplo incluye una descripción de estudios *in vivo*.

10 Para determinar los efectos de anticuerpo SAM-6 sobre el crecimiento de células tumorales *in vivo*, se usó un sistema de células de carcinoma de estómago de ratón desnudo-humano. Se inyectó una concentración de 2×10^6 células procedentes de la estirpe celular 23132/87 de carcinoma de estómago humano, intraperitoneal (i. p.), en ratones NMRI nu/nu. Nueve días después de la inoculación de células tumorales, se inyectaron diferentes dosis de anticuerpo SAM-6, i. p. La IgM de control humana no relacionada así como disolución de NaCl (0,9%) sirvieron como controles negativos. Se proporcionó el anticuerpo de nuevo los días 11, 14, 16 y 17 post-implantación de células de carcinoma. Se inyectaron ratones de control con 750 µg de IgM humana no relacionada (IgM Chrompure, Dianova, Hamburg, Alemania).

15 Durante todo el estudio, se controló el crecimiento del tumor de manera macroscópica. Después de 18 días se sacrificaron los ratones, se determinaron los volúmenes de los tumores y se usó la prueba t de Student para comparar los tamaños de los tumores entre los grupos de tratamiento y de control. Los tumores que se desarrollaron durante el transcurso del estudio mostraron una reducción significativa de volumen cuando se trataron con anticuerpo SAM-6 (Fig. 21). Por otra parte, la reducción de volumen de tumor en ratones tratados con anticuerpo SAM-6 depende de la dosis. Los ratones ya tratados con 50 µg de anticuerpo SAM-6 mostraron un volumen de tumor claramente reducido comparado con los grupos de control. Los animales tratados con 250 µg respectivamente 500 µg de anticuerpo SAM-6 presentaron volúmenes de los tumores estadísticamente significativamente más pequeños (Prueba t, $p < 0,05$ para ambas concentraciones) cuando se compara con el control de IgM. Sin embargo, los animales tratados con 750 µg de anticuerpo SAM-6 no muestran una reducción significativa en el volumen del tumor.

25

REIVINDICACIONES

1. Una glucoproteína aislada o purificada indicada como Receptor de SAM-6 (SAM-6/R), en la que dicha glucoproteína de SAM-6/R presenta un peso molecular aparente en un intervalo de aproximadamente 80-82 kilodaltons (kDa), cuando se determina por electroforesis en gel desnaturalizante, una secuencia que comprende la SEC ID N°: 1, presenta al menos un resto carbohidrato unido a nitrógeno (N) u oxígeno (O) distinto de Grp78, en la que un anticuerpo indicado SAM-6 se une específicamente a la glucoproteína y en la que el tratamiento de la glucoproteína de SAM-6/R con una O-glucosidasa reduce la unión del anticuerpo SAM-6 a la glucoproteína, en la que el anticuerpo SAM-6 comprende:
- 5 (a) una secuencia de la región variable de cadena pesada, en la que la secuencia de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 15 y
- 10 (b) una secuencia de la región variable de cadena ligera, en la que la secuencia de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 13.
2. La glucoproteína aislada o purificada según la reivindicación 1, en la que el tratamiento de la glucoproteína de SAM-6/R con una O-glucosidasa reduce la unión de un anticuerpo indicado SAM-6 a la glucoproteína.
- 15 3. La glucoproteína según la reivindicación 1 ó 2, en la que el resto carbohidrato se une a un resto asparagina, serina o treonina de la SEC ID N°: 1.
4. La glucoproteína según la reivindicación 1 ó 2, en la que el anticuerpo SAM-6 como se definió en la reivindicación 1 se une a una porción de la glucoproteína que comprende el resto carbohidrato unido a N u O o al resto carbohidrato unido a N u O.
- 20 5. La glucoproteína según la reivindicación 1 ó 2, en la que la glucoproteína se caracteriza además como que se expresa en una estirpe celular de carcinoma de páncreas o estirpe celular de carcinoma gástrico indicada respectivamente as BXP-3 (Depósito ATCC N° CRL-1687) o 23132/87 (Depósito DSMZ N° ACC 201).
6. Una secuencia de ácidos nucleicos capaz de codificar la glucoproteína según la reivindicación 1 ó 2 o una subsecuencia de los mismos capaz de tener unidos a la misma al menos un resto carbohidrato unido a nitrógeno (N) u oxígeno (O) distinto de un resto carbohidrato de Grp78.
- 25 7. Una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida específicamente a las secuencias de ácidos nucleicos según la reivindicación 6.
8. Una célula hospedadora transformada con el ácido nucleico que codifica la glucoproteína según la reivindicación 1 ó 2.
- 30 9. Un anticuerpo aislado o purificado o subsecuencia del mismo que comprende:
- (a) una secuencia de la región variable de cadena pesada, en la que la secuencia de la región variable de cadena pesada comprende:
- (i) una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia mostrada en la SEC ID N°: 18 y
- (ii) una región determinante de la complementariedad (CDR) con identidad del 100% para la CDR3 (ARDRLAVAGRPFDY) mostrada en la SEC ID N°: 17 y
- 35 (b) una secuencia de la región variable de cadena ligera, en la que la secuencia de la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia mostrada en la SEC ID N°: 13.
10. El anticuerpo aislado o purificado o subsecuencia del mismo según la reivindicación 9, en el que las tres CDR de la región variable de cadena pesada comprenden o consisten en: CDR1, SYAMH, CDR2, VISYDGSNKYYADSVKG y CDR3, ARDRLAVAGRPFDY y las tres CDR de la región variable de cadena ligera comprenden o consisten en: CDR1, SGDKLGDKYAC, CDR2, QDSKRPS y CDR3, QAWDSSIVV.
- 40 11. Una composición farmacéutica que comprende la glucoproteína de SAM-6/R de las reivindicaciones 1 ó 2 o un anticuerpo o subsecuencia del mismo según la reivindicación 9 ó 10 y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 45 12. El anticuerpo o subsecuencia del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, para uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo celular.
13. El anticuerpo o subsecuencia del mismo para uso según la reivindicación 12, en el que el trastorno hiperproliferativo celular afecta o está presente al menos en parte en: cerebro, cabeza o cuello, mama, esófago, boca, nasofaringe, nariz o senos nasales, estómago, duodeno, íleon, yeyuno, pulmón, hígado, páncreas, riñón,
- 50

glándula suprarrenal, tiroides, vejiga, colon, recto, próstata, útero, cérvix, ovario, médula ósea, linfa, sangre, hueso, testículos, piel o músculo o sistema hematopoyético.

14. El anticuerpo o subsecuencia del mismo para uso según la reivindicación 12, en el que el trastorno hiperproliferativo celular comprende una neoplasia, tumor o cáncer.

5 15. El anticuerpo o subsecuencia del mismo para uso según la reivindicación 14, en el que la neoplasia, tumor o cáncer comprende un sarcoma, carcinoma, adenocarcinoma, melanoma, mieloma, blastoma, glioma, linfoma o leucemia.

16. El anticuerpo o subsecuencia del mismo para uso según la reivindicación 15, en el que el mieloma es mieloma múltiple.

Resumen de Muerte Celular Programada de SAM-6 Análisis: Ruta "Lipoptótica"

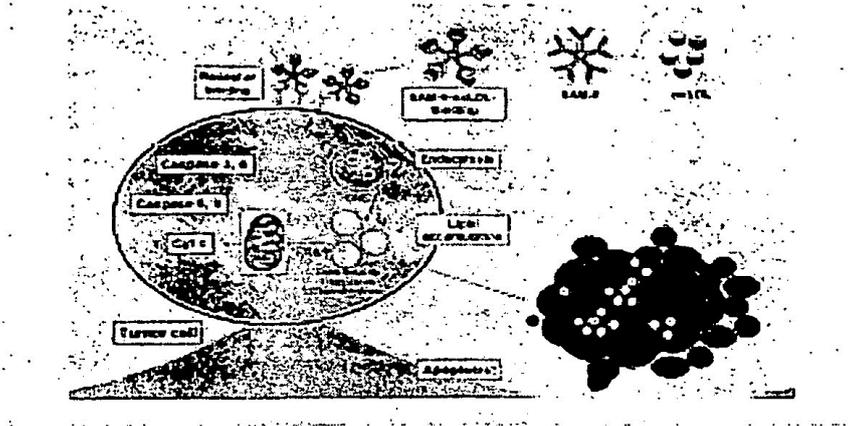


Figura 1: Ruta lipoptótica de SAM-6

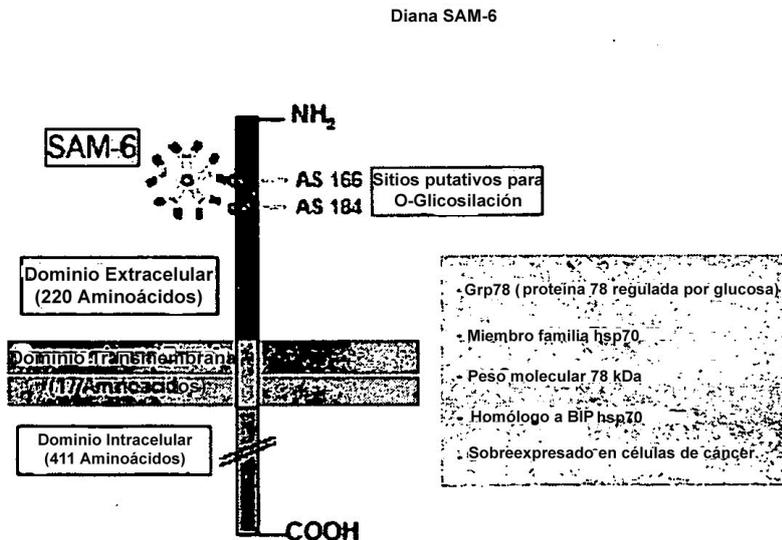


Figura 2: Diana SAM-6

Método de Western representativo de SAM-6 y control de IgM no relacionada en extractos de membrana

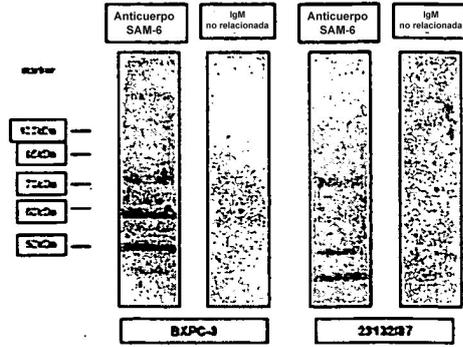


Figura 3: Método Western representativo de SAM-6 y control de IgM no relacionada en extractos membrana

Cromatograma después de cromatografía de exclusión por tamaños

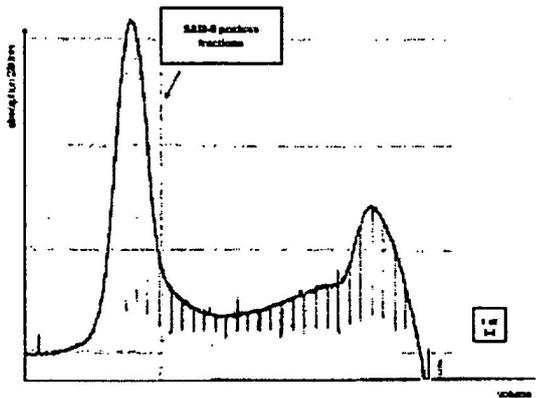


Figura 4: Cromatograma después de cromatografía de exclusión por tamaños

Análisis por método Western de fracciones positivas de SAM-6 después de cromatografía de exclusión por tamaños

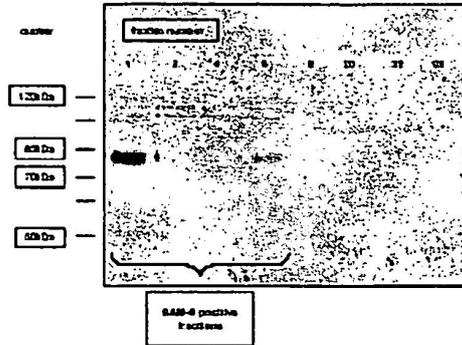


Figura 5: Análisis por método Western de fracciones positivas de SAM-6 después de cromatografía de exclusión por tamaños

Tinción de Coomassie de gel SDS-Page después de cromatografía de exclusión por tamaños

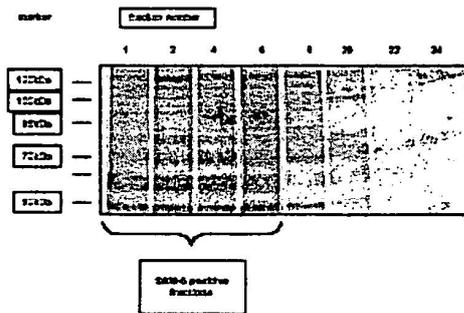


Figura 6: Tinción de Coomassie de gel SDS-Page después de cromatografía de exclusión por tamaños

Cromatograma después de cromatografía de intercambio iónico

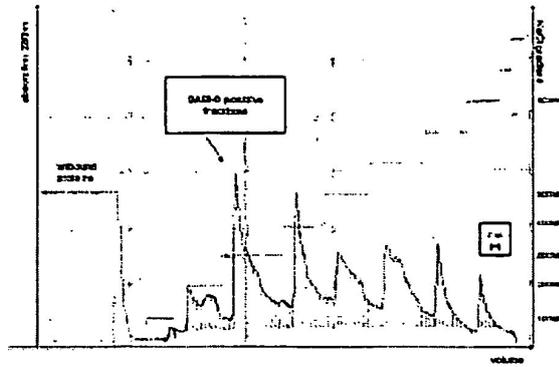


Figura 7: Cromatograma después de cromatografía de intercambio iónico

Análisis por método Western de fracciones positivas de SAM-6 después de cromatografía de intercambio iónico

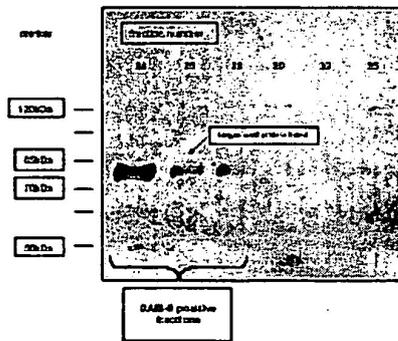


Figura 8: Análisis por método Western de fracciones positivas de SAM-6 después de cromatografía de intercambio iónico.

Tinción con Azul Coomassie después de cromatografía de intercambio iónico

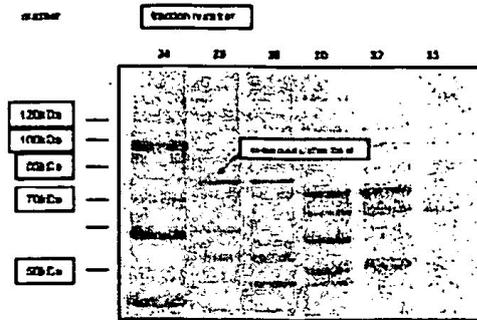


Figura 9: Tinción con Azul Coomassie después de cromatografía de intercambio iónico

Figura 10: Mapa de masa peptídica de proteína de 80 kDa aislada obtenida por análisis de espectrometría de masas MALDI

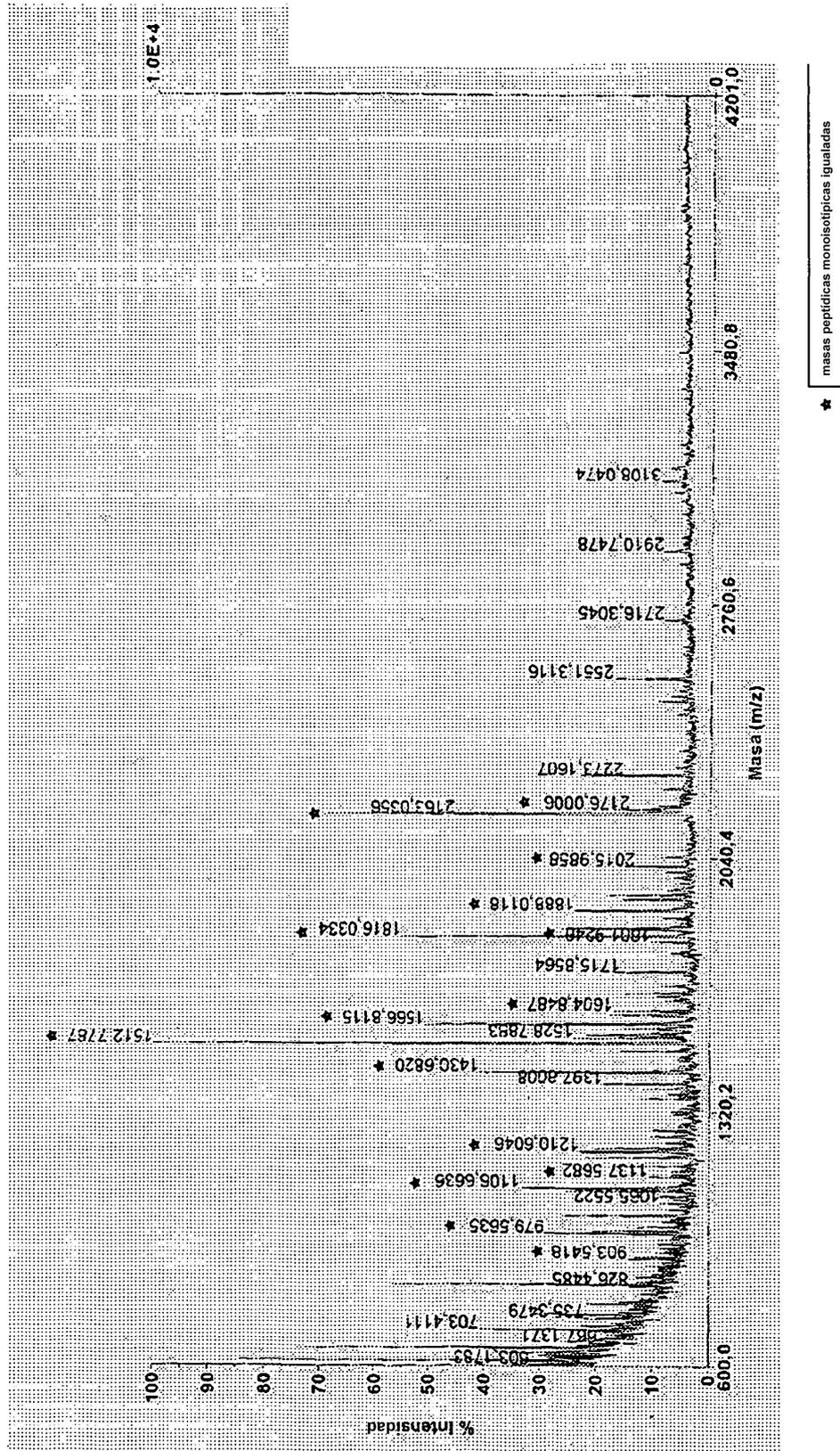


Figura 11: Alineación de secuencias peptídicas derivadas de manera experimental asignadas a GRP78 humano y la secuencia de proteínas de la base de datos de GRP78/BiP humana [NP_005338], SEC ID N°: 1

	Traslación ER/sitio escisión	
1	N mklslvaaml lllsaaraee edkkedvgtv vgidlgttys cvgvfkngrv eiiandqgnr	
61	itpsyvaftp egerligdaa knqltsnpen tvfdakrllig rtwndpsvqq dikflpfkvv	
121	ekktkpyiqv digggqtktf apeeisamv1 tkmketaeay lgkkythavv tvpayfndaq	
181	rقاتdagti aglnvmriin eptaaaiayg ldkregekni lvfdlgggtf dvsllttidng	Dominio transmembrana
241	vfevvatngd thlggedfdq rmehfikly kkkgtgkdvrc dnravqklrr evekakra1s	
301	sqhqarieie sfyegedfse tltrakfeel nmdlfrstmk pvqkvledsd lkksdideiv	
361	lvggstrikp iqqlvkeffn gkepsrginp deavaygaav qagvlsqgdq tgdvlldvc	
421	pltlgietyg gvmtkkliprn tvvptkksqi fstasdngpt vtikvyeger pltkdnhllg	
481	tfdltgippa prgvpqievt feidvngilr vtaedkgtgn knkititndq nrltpeeier	
541	mvndaekfae edkklkerid trnelesyay slknqigdke klggklssed ketmekavee	actividad ATPasa
601	kiewleshqd adiedfkakk keleeivqpi isklygsagp pptgeedtae kdel C	

● péptidos igualados ● posibles sitios O-glucosilación extracelular □ región señal

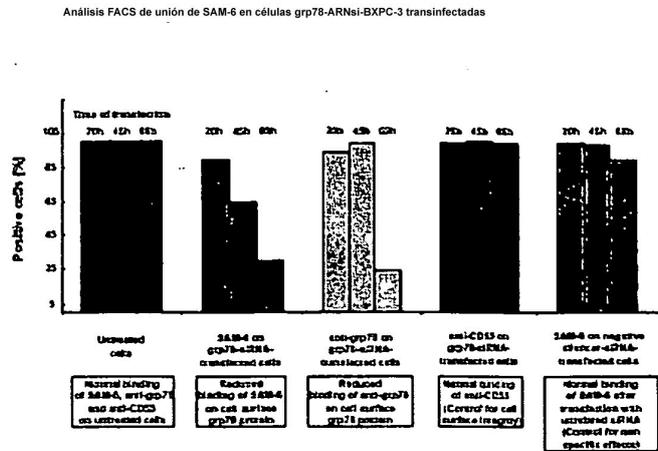


Figura 12: Análisis FACS de unión SAM-6 en células grp78-ARNsi-BXPC-3 transfectadas

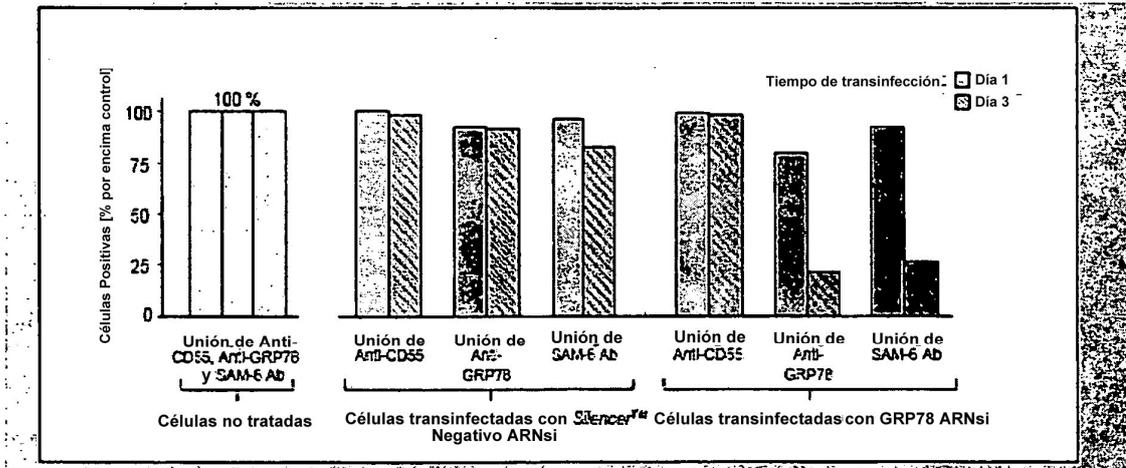


Figura 13: Análisis de unión de SAM-6 en células Grp78-ARNsi- BXPC-3 transfectadas

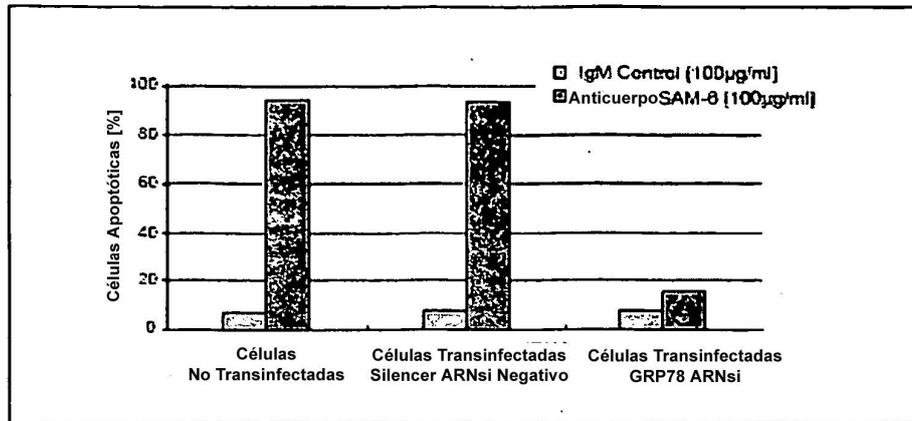


Figura 14: ELISA de Muerte Celular con grp78-ARNsi-células BXPC-3 transfectadas

Análisis Método Western
de anticuerpo SAM-6 en extractos de membrana de estirpe celular BXPC-3 de carcinoma de páncreas después de desglucosilación

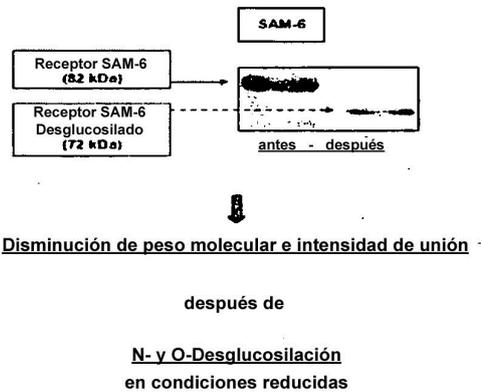


Figura 15: Análisis por Método Western: Unión de anticuerpo SAM-6 en extractos de membrana de estirpe celular BXPC-3 de carcinoma de páncreas

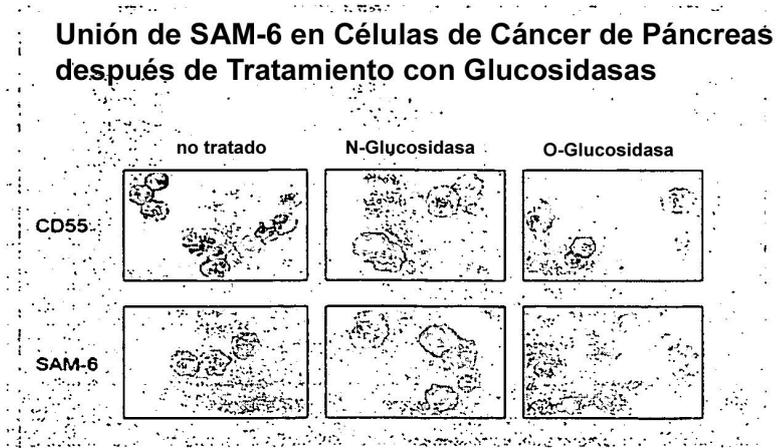


Figura 16: Unión de SAM-6 en células de cáncer de páncreas después de tratamiento con glucosidasas

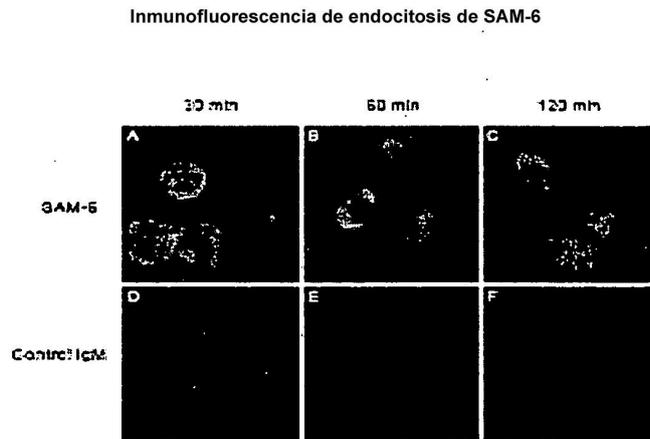


Figura 17: Inmunofluorescencia de endocitosis de SAM-6

Tinción con Sudán III de Células (BXPc-3) de Cáncer de Páncreas inducido por Anticuerpo

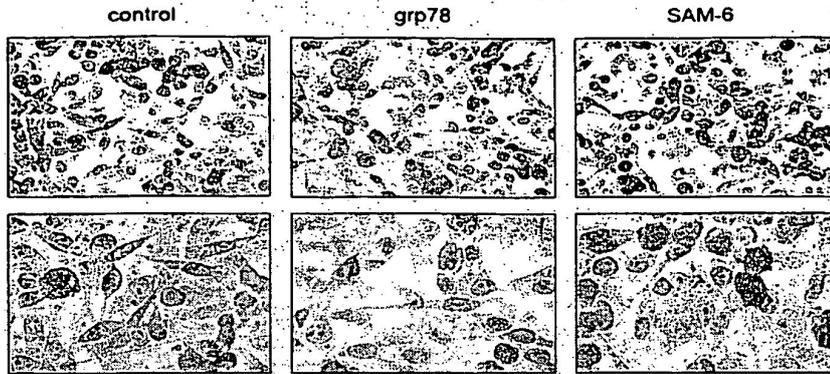


Figura 18: Tinción con Sudán III de células (BXPc-3) de cáncer de páncreas inducido por anticuerpo

Análisis de muerte celular programada inducida por SAM-6 por medición de liberación de citocromo c

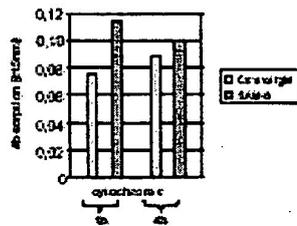


Figura 19: Análisis de muerte celular programada inducida por SAM-6 por medición de liberación de citocromo c

Análisis de muerte celular programada inducida por SAM-6 por medición de activación de caspasas -8, -9, -3 y -6

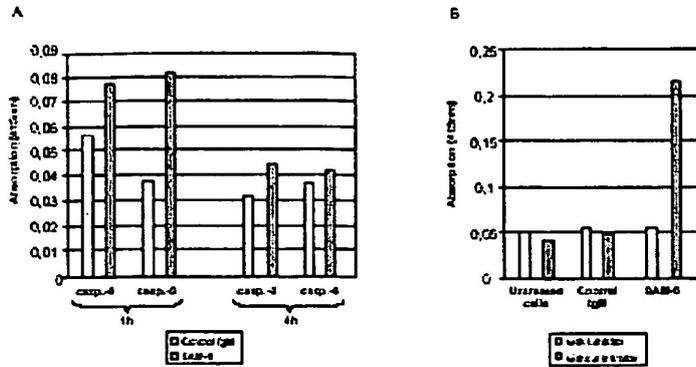


Figura 20: Análisis de muerte celular programada inducida por SAM-6 por medición de activación de caspasas -8, -9, -3 y -6

Inhibición Dependiente de la Dosis de SAM-6 de Crecimiento de Xenoinjerto de Tumor de Carcinoma de Estómago

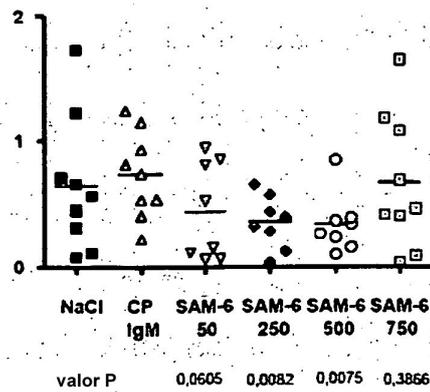


Figura 21: Inhibición dependiente de la Dosis de SAM-6 de crecimiento de xenoinjerto de tumor de carcinoma de estómago